



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

#7
App'n No. 09/920, 653
Applicant: NODA et al.
Att'y Dkt. 31671-1364
1061

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2001年 7月23日

出願番号
Application Number:

特願2001-222263

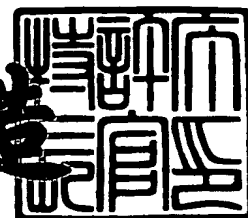
出願人
Applicant(s):

岡崎国立共同研究機構長

2001年 8月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3076246

【書類名】 特許願
【整理番号】 U2001P059
【提出日】 平成13年 7月23日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A01K 67/027
C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美台2丁目7番地9
【氏名】 野田 昌晴

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南2丁目2番地1
【氏名】 渡邊 栄治

【特許出願人】

【識別番号】 391012718
【氏名又は名称】 岡崎国立共同研究機構長
【代表者】 毛利 秀雄

【代理人】

【識別番号】 100107984
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-237320
【出願日】 平成12年 8月 4日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-241637
【出願日】 平成12年 8月 9日

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1

特 2 0 0 1 - 2 2 2 2 6 3

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 $\text{Na}_v 2$ チャネル遺伝子欠損非ヒト動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すことを特徴とするヌル変異非ヒト動物。

【請求項 2】 $\text{Na}_v 2$ 遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項 1 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 3】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 2 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 4】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 3 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 5】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 6】 タンパク質が、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 7】 配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA からなる請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 8】 配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA からなる請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 9】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質。

【請求項 10】 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなる請求項 9 記載のタンパク質。

【請求項 11】 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは

数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる請求項 9 記載のタンパク質。

【請求項 1 2】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

【請求項 1 3】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 2 記載の融合タンパク質。

【請求項 1 4】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 1 5】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 4 記載の抗体。

【請求項 1 6】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 4 又は 1 5 記載の抗体。

【請求項 1 7】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 1 8】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 7 記載の宿主細胞。

【請求項 1 9】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2 0】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 9 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2 1】 非ヒト動物が、マウス又はラットである請求項 1 9 又は 2 0 記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2 2】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 3】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞が、請求項 1 7 又は 1 8 記載の宿主細胞である請求項 2 2 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 4】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の非ヒト動物又は請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 5】 請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質。

【請求項 2 6】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ～ 1 1 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 2 5 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能若しくは発現を促進する物質を

んでなる医薬組成物。

【請求項 2 7】 脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ～ 1 1 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 2 5 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す、Na_v2 チャネル遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、それをコードする遺伝子等に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

電位依存性ナトリウムチャネルは、電位依存性カリウムチャネルとともに、神経細胞、筋肉細胞等の興奮性細胞において活動電位の発生と伝播に中心的役割を担うイオンチャネルとして知られている。ナトリウムチャネルタンパク質は、電位検出系をもつイオン選択的チャネルを構成し、270 kDa の糖タンパク質からなる α -サブユニットと、1 つ又は 2 つのより小さい β -サブユニットから構成されている。電位依存性ナトリウムチャネルは、細胞膜が静止電位（通常 -70 ～ -90 mV）にある時は閉じているが、細胞膜が脱分極するとチャネルが開き、1 msec 程度後にチャネルが閉じることから、ナトリウムチャネルタンパク質分子は、膜電位を感受する電位センサーとそれに連動して動く活性化依存性、ナトリウムイオンを選択的に透過するための選択性フィルター、及び不活性化依存性を構成しているといわれている。

【 0 0 0 3 】

本発明者等による脳のナトリウムチャンネルタンパク質 α -サブユニット cDNA タイプ I、II 及び III の同定 (Nature 320, 188-192 (1986), FEBS Lett. 228, 187-194 (1988)) 以来、多くの構造的に関連する α -サブユニットのアイソフォームが各種の組織からクローニングされており、これらは多重遺伝子族を形成している。最近になって興奮性細胞のほかにも、グリア細胞もまた電位感受性ナトリウム電流を発現することが見出され (Trends Neurosci. 19, 325-332 (1996))、in situ ハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンブロット及び免疫細胞化学などの手法によって、グリア細胞における脳-タイプ I、II、III、H1、Na_G、NaCH6 等の存在が報告されている (Glia 26, 92-96 (1999))。しかし、いわゆる電氣的に非興奮性の細胞における電位依存性ナトリウムチャンネルの機能は解明されていない。

【 0 0 0 4 】

数年前、電位依存性ナトリウムチャンネル α -サブユニットと相同性のある部分 cDNA がラット星状膠細胞に由来する cDNA ライブラリーからクローニングされ Na_G と命名された (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7272-7276 (1992))。これに引き続き同様な α -サブユニットアイソフォームが各種の動物種から独立にクローニングされている。例えば、ヒトの心臓からの Na_v2.1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4893-4897 (1992))、マウスの動脈腫瘍細胞株からの Na_v2.3 (J. Biol. Chem. 269, 30125-30131) 及び Na_G のスプライシングヴァリエントに相当するラットの脊髄神経節由来の SCL11 が報告されている (FEBS Lett. 400, 183-187 (1997))。これらは配列の相同性から、異なる種における対応する遺伝子 (species orthologues) とも考えられ、電位依存性ナトリウムチャンネル (NaCh) α -サブユニットファミリーの中で異なるサブファミリーすなわちサブファミリー 2 NaCh (Na_v2) に分類することができる。それらの全アミノ酸配列は、先にクローニングされた電位依存性ナトリウムチャンネル群に比べ相同性が 50% 以下と低く、イオン選択性や電位依存性の活性化・不活性化に関連する領域においてすらもその配列は特異的である。それらの領域は他の全てのサブファミリーメンバーにおいては完全に保存されていることから、Na_v2 は

特別なチャネル特性をもっていると考えられるが、機能的 Na_v2 チャネルをアフリカツメガエル卵母細胞、CHO細胞、HEK293細胞などを用いる異種発現系で発現させる試みはこれまで成功しておらず、生体内における Na_v2 チャネルの機能については全くわかっていなかった。

【0005】

$\text{NaG}/\text{SCL11}$ は、星状膠細胞からクローニングされたので、星状膠細胞で発現される電位依存性ナトリウムチャネル(NaCh)の1つと考えられてきたが、その後のin situハイブリダイゼーションにより Na_v2 は生体内では星状膠細胞に発現しておらずシュワン(Schwann)細胞及び脊髄感覚ニューロンにおいて発現していることが明らかにされた(Glia 21,269-276(1997))。 NaG のmRNAは神経系以外、特に肺や心臓に比較的高レベルで検出され、さらに、 NaG のmRNAが中枢神経系に存在することがRNaseプロテクション及びノーザンブロット法で示されたが、非同位体プローブを用いるin situハイブリダイゼーションによっては NaG のmRNAは中脳核V(mesencephalic nucleus V)以外において検出できないことが報告されている(Mol.Brain Res.45,71-82(1997))。このことから、 NaG のmRNAは中枢神経系全体に低レベルで発現するか又は中枢神経系の特定の領域で限定的に発現しているであろうと考えられる。 NaG チャネルがこのように幅広い組織、電氣的に非興奮性の細胞を含む幅広い細胞種に分布していることから、 NaG チャネルは活動電位の発生と伝播以外の機能があると考えられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

現在まで、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ異常な高張塩分の摂取挙動を示す、塩分過剰摂取実験モデル動物は知られていない。また、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質やそれをコードする遺伝子は知られていない。本発明の課題は、かかる塩分過剰摂取実験モデル動物として有用な、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す

ナル変異非ヒト動物、例えば Na_v2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質やそれをコードする遺伝子を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生体内における機能が不明であった Na_v2 チャネルの機能や役割を明らかにするために鋭意研究し、 Na_v2 チャネルノックアウトマウスを作製し、 Na_v2 チャネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることを確認し、この Na_v2 チャネルノックアウトマウスが水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ高張塩分を多量に摂取するという異常な挙動を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すことを特徴とするナル変異非ヒト動物（請求項1）や、 Na_v2 遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項1記載のナル変異非ヒト動物（請求項2）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項2記載のナル変異非ヒト動物（請求項3）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項3記載のナル変異非ヒト動物（請求項4）に関する。

【0009】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子（請求項5）や、タンパク質が、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質である請求項5記載の遺伝子（請求項6）や、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAからなる請求項5

記載の遺伝子（請求項 7）や、配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA からなる請求項 5 記載の遺伝子（請求項 8）に関する。

【 0 0 1 0 】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質（請求項 9）や、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなる請求項 9 記載のタンパク質（請求項 1 0）や、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる請求項 9 記載のタンパク質（請求項 1 1）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質（請求項 1 2）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 2 記載の融合タンパク質（請求項 1 3）に関する。

【 0 0 1 1 】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 1 4）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 4 記載の抗体（請求項 1 5）や、抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 4 又は 1 5 記載の抗体（請求項 1 6）に関する。

【 0 0 1 2 】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞（請求項 1 7）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用する

タンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 7 記載の宿主細胞（請求項 1 8）に関する。

【 0 0 1 3 】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物（請求項 1 9）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質が、請求項 1 0 又は 1 1 記載のタンパク質である請求項 1 9 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 2 0）や、非ヒト動物が、マウス又はラットである請求項 1 9 又は 2 0 記載のトランスジェニック非ヒト動物（請求項 2 1）に関する。

【 0 0 1 4 】

また本発明は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 2）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞が、請求項 1 7 又は 1 8 記載の宿主細胞である請求項 2 2 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 3）や、請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の非ヒト動物又は請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか記載の非ヒト動物と、被検物質とを用いることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において N a イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 4）に関する。

【 0 0 1 5 】

また本発明は、請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は発現促進若しくは抑制物質（請求項 2 5）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ～ 1 1 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 2 5 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 2 6）や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 9 ～ 1 1 のいずれか記載のタンパク質又は請求項 2 5 記載の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 2 7）に関する。

【 0 0 1 6 】

【発明の実施の形態】

本発明のヌル変異非ヒト動物としては、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す非ヒト動物であれば特に制限されるものではないが、かかる非ヒト動物として、 $\text{Na}_v 2$ 遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物を具体的に例示することができる。ここで、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動とは、例えばマウスにおいては 2 4 時間水分飢餓条件下で 0. 3 M の食塩水の摂取量が野生型、好ましくは同腹の野生型に比べ 1. 5 倍以上、より好ましくは 2 倍以上摂取する挙動をいい、また、 $\text{Na}_v 2$ 遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物とは、 $\text{Na}_v 2$ をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子が破壊・欠損・置換等により不活性化され、 $\text{Na}_v 2$ を発現する機能を

失った非ヒト動物をいい、また非ヒト動物とは、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。以下、非ヒト動物がマウスの場合を例にとって説明する。

【 0 0 1 7 】

Na_v2 ノックアウトマウスの作製法としては、 Na_v2 を発現する機能を失ったノックアウトマウスを作製することができる方法であればどのような作製法でもよいが、例えば、マウス Na_v2 の種対応物であるラット Na_v2 をコードする cDNA をプローブとして、マウスのゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングし、ゲノム DNA の Na_v2 遺伝子を単離し、 Na_v2 のエキソン部分に、例えばネオ遺伝子等マーカー遺伝子を挿入してターゲットベクターを作製し、作製されたターゲットベクターをエレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入し、相同的組換えを起こした ES 細胞を選択し、この ES 細胞系を用いて生殖系列のキメラマウスを作製し、野生型マウスと交配させることによって得られるヘテロ接合体マウス (F1 : 雑種第一代) 同士を交配させることによって、メンデルの法則に従い産生する Na_v2 ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを作製することができる。

【 0 0 1 8 】

本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質としては、脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、配列番号 3 に示される Na_v2 (GenBank のアクセッション番号 : L36179) や、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、これらの組換えタンパク質を具体的に挙げるができる。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質は、その DNA 配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。

【 0 0 1 9 】

また、本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子としては、配列表の配列番号3に示されるNa_v2をコードする遺伝子、例えば、配列番号2に示されるNa_v2遺伝子や、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子DNAや、これら遺伝子DNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするDNAも包含され、これらはそのDNA配列情報等に基づき、例えば細胞株R1から作られたマウスのゲノムライブラリーや、129/SvJマウス遺伝子ライブラリー等から公知の方法により調製することができる。

【0020】

また、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、マウス由来のDNAライブラリーに対してストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、Na_v2遺伝子と同効な目的とするヒトNa_v2.1 (GenBankアクセッション番号: M91556) やラットNaG/SC L11 (GenBankアクセッション番号: Y09164) 等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと同等のストリンジエンシーを実現することが可能である。

【 0 0 2 1 】

本発明の融合タンパク質とは、 $\text{Na}_v 2$ 等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の精製や、かかるタンパク質の検出や、かかるタンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

【 0 0 2 2 】

本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、ヒトの塩分過剰摂取による慢性疾患などの $\text{Na}_v 2$ の変異又は欠失に起因する疾病の診断や、 $\text{Na}_v 2$ 等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

【 0 0 2 3 】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、抗原ペプチドを免疫原としてウサギ等を免疫し、常法により抗血清を作製し、作製した抗血清を、免疫原に用いたペプチドが固定化されたカラムによって精製することにより調製することができる。また、モノクローナル抗体は、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の方法により調製することができる。以下に脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質として、マウス由来の Na_v2 を例に挙げてマウス由来の Na_v2 に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、すなわち抗 mNa_v2 モノクローナル抗体の作製方法を説明する。

【 0 0 2 4 】

上記抗 mNa_v2 モノクローナル抗体は、抗 mNa_v2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインビボ又はインビトロで常法により培養することにより生産することができる。例えば、インビボ系においては、齧歯動物、好ましくはマウス又はラットの腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むRPMI 1640又はMEM等の細胞培養培地を例示することができる。

【 0 0 2 5 】

抗 mNa_v2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、マウス等か

ら得られた Na_v2 を用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスNS-1細胞(ATCC TIB-18)とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗 mNa_v2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出することができる。また、かかるモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、アフィニティークロマトグラフィー等の液体クロマトグラフィーを具体的に例示することができる。

【0026】

また、本発明の前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

【0027】

また上記抗 mNa_v2 モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC(フルオレセインイソシアネート)又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 又は ^3H 等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫

学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

【0028】

本発明はまた、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及びSambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞 (ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができる。

【0029】

また、発現系としては、上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソード及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、ア

デノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【 0 0 3 0 】

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997) らの方法などを用いることができ、また、かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗Na_v2モノクローナル抗体等の抗脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質抗体を結合させたカラムや、上記Na_v2等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に通常のペプチドタグを付加した場合には、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらの脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を得ることができる。

【 0 0 3 1 】

本発明において、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞

においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいう。本発明における非ヒト動物としては、ウサギや、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 3 2 】

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質のトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

【 0 0 3 3 】

脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質のトランスジェニックマウスは、Na_v2等の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードするcDNAにチキンβ-アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビットβ-グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺

伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記 cDNA を有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNA を有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗 DNA を抽出し、導入した脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いた PCR 法等により行うことができる。

【 0 0 3 4 】

そしてまた、前記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質や、かかるタンパク質をコードする遺伝子や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質とマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質に対する抗体や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物や、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す変異非ヒト動物や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現する細胞等を用いると、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞において Na イオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることができる。こ

これらのスクリーニングにより得られたものは、ヒトの塩分過剰摂取による慢性疾患の抑制剤、予防剤又は治療薬や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質である可能性がある。

【0035】

上記スクリーニング方法としては、例えば、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いる方法や、本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物と、被検物質とを用いる方法等を挙げることができる。

【0036】

上記脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と、被検物質とを用いたスクリーニング方法としては、例えば、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質を発現している細胞と被検物質とを接触せしめ、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法を挙げることができる。

【0037】

本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物と、被検物質とを用いたスクリーニング方法としては、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下

では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質をコードする遺伝子が過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物から得られる神経細胞と被検物質とをインビトロで接触せしめ、前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ食塩水を投与した後、該非ヒト動物から得られる神経細胞を被検物質の存在下で培養し、前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質と食塩水を投与した後、該非ヒト動物から得られる神経細胞における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法や、前記ヌル変異非ヒト動物又は前記トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質と食塩水を投与した後、該非ヒト動物における前記タンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価する方法などを具体的に挙げることができる。

【0038】

また、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の変化を測定・評価するに際し、対照として野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。なお、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能とは、生体中の浸透圧調節機能、すなわち脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターしている脳内神経細胞において、Naイオンレベルのセンサーとして作用する機能をいい、かかる機能の変化としては、体液オスモル濃度の感覚経路における機能の変化や、水分及び食塩の摂取に対する嗜好－嫌悪応答の変化などを具体的に例示することができるがこれらに限定されるものではない。

【0039】

また、本発明の医薬組成物は、有効成分として前記本発明の脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとし

て作用するタンパク質や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進若しくは抑制物質又は脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の発現促進若しくは抑制物質を含んでものであれば特に制限されるものではなく、これら医薬組成物は、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能促進又は発現増強を必要としている患者や、脳脊髄液及び血中の浸透圧をモニターする脳内神経細胞においてNaイオンレベルのセンサーとして作用するタンパク質の機能又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いることができる。

【 0 0 4 0 】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[ターゲッティングベクターの構築]

ターゲッティングベクターを構築するため、タンパクコーディングエクソン1、2及び3を含むマウスのゲノム断片を、ラットのNaG/SCL11プローブによってクローニングした。まず、細胞株R1から作られたマウスのゲノムライブラリー（大阪大学の森博士から供与）から、ラットのNaGcDNAの446bp断片（最初の3つのコーディングエクソンを含むヌクレオチド残基11-456：GenBankアクセス番号Y09164：配列番号1）でハイブリダイズさせて9個の独立のゲノムクローンを分離した。数種の制限酵素を用いるサザンブロット分析により、これら全てのオーバーラップクローンが単一のゲノム遺伝子座に由来することを確認した。ハイブリダイゼーションポジティブな3.2kb及び3.7kbのHind III断片をpBluescriptISK(-)（Stratagene社製）にサブクローンした後、DNA配列を決定した（配列はGenBankのアクセス番号AF190472：配列番号4）。3.2kb断片は、タンパクコーディングエクソン1（5'非翻訳領域の13塩基とマウスNa_v2タンパクコーディング配列の最初の238塩基：GenBankアクセス番号L36179のヌクレオチド残基238-490）を含み、3.7kb断片はエクソン2（同ヌクレオ

チド残基491-609)及びエクソン3(同ヌクレオチド残基610-701)を含んでいた。この3つのエクソンをコードしているDNA配列はTamkun等(J.Biol.Chem.269,30125-30131(1994))によってクローニングされたマウスのNa_v2.3 cDNAと同じであった。クローニングされたゲノム断片は4つの制限酵素(BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III)についてのサザンブロットの結果、マウスのゲノムDNAと同じ制限酵素地図を示した。この知見から、マウスのNa_v2.3はラットのNa_vGの種対応物であることが明らかになった。したがって、Na_v2.3、Na_vG及びSCL11をNa_v2と命名した。

【0041】

ターゲッティングベクターを構築するために、lacZ遺伝子をマウスNa_v2遺伝子のタンパクコーディングエクソン1に挿入し、マウスNa_v2のN末端の20アミノ酸配列がβ-ガラクトシダーゼと融合するようにデザインした。すなわち、3つのエクソンを含む12.5 kbのSal I断片をpDT-A (Anal. Biochem.214,77-86(1993))のXho Iサイトに挿入し、次いで、lacZ-neoカセットのSal I-Xho I断片をエクソン1の内因性のXho Iサイトに導入した(図1a参照)。これによってマウスNa_v2タンパクの最初の20アミノ酸をβ-ガラクトシダーゼのN末端に融合した蛋白が発現する。また、ターゲットマウスにおいてマウスNa_v2遺伝子の代わりにlacZ遺伝子を確実に発現させるために、lacZ-neoカセットを挿入したこと以外は、元のマウスNa_v2遺伝子のゲノム構造そのままとした。サザンブロットスクリーニングにおいて外因的制限サイトとして利用することができるように、lacZ-neoカセットの5'末端にEcoR Iリンカーを予め挿入した。なお、図1a中、上段はターゲットベクターの制限酵素地図を、中段は野生型のマウスNa_v2遺伝子座を、下段は組換え体の遺伝子座をそれぞれ示し、図中の制限サイトBはBamH I、BgはBgl II、EはEcoR I、HはHind III、XはXho Iをそれぞれ意味する。

【0042】

[Na_v2ノックアウトマウスの作製]

線状化した上記ターゲットベクターを、エレクトロポレーション法によってES細胞(129/SVマウス由来のR1セルライン)に導入した。文献(Neur

osci.Lett.247,135-138(1998)) 記載の方法に準じて、ネオマイシン耐性ESクローンをG418によって選択し、ターゲットクローンのスクリーニングを行った。相同組換え体をプローブ1 (図1a参照; エクソン1のXho Iから約8 kb上流に位置している0.3 kbのEcoR I-Xba I断片) によりEcoR I消化を用いるサザンブロット法で確認した。また、選択されたクローンをプローブ2 (neo遺伝子由来の0.6 kbのPst I断片) でチェックした。1つのセンスプライマー (プライマー1、エクソン1の5' 末端領域にあるATGTTGACTTC CCCAGAGCC: 配列番号5) 及び2つのアンチセンスプライマー (プライマー2、lacZの5' 末端領域にあるAAC CAGGCAAAGCGCCAT TC: 配列番号6、プライマー3、エクソン1の3' 末端領域にあるCATCT TCCAAGGGCTCTGACA: 配列番号7) を用いるゲノムPCRにより標的とされる遺伝子座を確認した。PCR増幅は、EX-Taqポリメラーゼ (Takara社製) によりその製造者のプロトコルに従いプログラム可能なサーマルサイクラーを用いて2段階で実行した (第1段階; 95℃5分間、60℃1分間、72℃1分間。第2段階; 95℃30秒、60℃30秒、72℃1分間)。

【0043】

98個のESクローンから得られた、相同組換えが起こったアレルをもっていることが確認された2個のESクローンを、8細胞期のC57BL/6Jマウス胚に導入した。導入された胚はM16培地中で1夜胚盤胞まで培養し、7~10個の胚盤胞をICRマウスの子宮に移植した。このようにして得られた雄キメラマウスをC57BL/6J雌マウスと交配させ、同腹子からヘテロ接合体マウス (F1: 雑種第一代) を作出し、次いで、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせ、メンデルの法則に従い産生するNavy2欠損マウスを作製した。

【0044】

このヌル変異体動物 (マウスNavy2^{-/-}) は健康で、繁殖可能で見た目に正常であった。ヘテロ接合体動物の繁殖から得られた458匹の4週令のマウスの遺伝子型解析の結果、野生型は29.5% (n=135)、ヘテロ接合体は48.2% (n=221)、ホモ接合体は22.3% (n=102) であり、メンデル

比率に近かった。これらのことは、ヘテロ接合体及びホモ接合体における胚の発育及び身体機能が大きく傷害されないことを示している。マウス $\text{Na}_v 2$ は周生期に一過性に子宮平滑筋に発現が誘導されることが報告されている(J.Biol.Chem. 269,30125-30131(1994)及びAm.J.Physiol.270,C688-696(1996))が、 $\text{Na}_v 2^{-/-}$ マウスにおいては子は正常に生まれたことは注目に値する。また、ヌル変異体における lacZ 発現パターンは発現の強さに差があるもののヘテロ接合体のそれと同じであったことは、マウス $\text{Na}_v 2$ の欠損はマウス $\text{Na}_v 2$ 発現細胞の分化又は生存能力に影響しないことを示している。

【 0 0 4 5 】

野生型(+/+), ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの尾からサンプルゲノムDNAを採取し、EcoR Iで消化したゲノムDNAをブロットした膜をターゲットベクターの5'側にある前記プローブ1とハイブリダイズさせたサザンブロット分析の結果を図1bに示す。図1bの右側には、野生型(18kb)及び組換型(10kb)の遺伝子型のサイズが示されている。また、野生型(+/+), ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスのゲノムPCR分析の結果を図1cに示す。図1cの右側には、野生型(200bp)と組換型(400bp)の遺伝子型のサイズが示されている。

【 0 0 4 6 】

[$\text{Na}_v 2$ ノックアウトマウスにおける $\text{Na}_v 2$ 不発現の確認]

変異体マウスのマウス $\text{Na}_v 2$ タンパク発現をウエスタンブロットで試験した。野生型(+/+), ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの肺組織サンプルをKnittle等の方法(Am.J.Physiol.270,C688-696(1996))により調製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロッティングを文献(Neurosci.Lett.247,135-138(1998))記載の方法で行った。抗マウス $\text{Na}_v 2.3$ 抗血清(コロラド州立大学Tumkun博士から供与)をPBSで1:500に希釈して使用した。イムノブロットは数種の非免疫血清とインキュベートし、非特異的な結合でないことを確認した。結果を図1dに示す。図1dの右側には、 $\text{Na}_v 2$ タンパク(220kDa)の位置が示されている。 $\text{Na}_v 2$ タンパクは高度にグリコシル化されておりSDS-含有緩衝液においてすら容易に凝集するた

め、ナトリウムチャネルは広いバンドとなっているが、ヘテロ接合体 ($\text{Na}_v 2^{+/-}$) マウスでは野生型の約半量のマウス $\text{Na}_v 2$ タンパクが肺膜から検出され、ホモ接合体 ($\text{Na}_v 2^{-/-}$) マウスではマウス $\text{Na}_v 2$ タンパクは検出されなかった。マウス $\text{Na}_v 2$ タンパクが発現していないことから、このアレルがヌル変異体であることがわかる。

【 0 0 4 7 】

[X-Gal 染色による $\text{Na}_v 2$ ノックアウトマウスにおける lacZ 発現の確認]

胚を 3.5% のホルムアルデヒド PBS 溶液中に室温にて 1 時間浸漬して固定し、正中線に沿って矢状面にかみそりでカットした。図 2 a は胚令 15 日 (E15) のマウス $\text{Na}_v 2^{+/-}$ の胚全体の X-Gal 染色を示しており、強い β -ガラクトシダーゼ活性が三叉神経節 (図 2 a 中の矢頭) 及び脊髄神経節 (同矢印) において観察された (参考写真 1 参照)。また、lacZ はこの E15 マウスの肺 (同星印) においても発現していた。これらの器官における lacZ の発現は成長しても持続し、脊髄神経節を X-Gal 染色後に薄い切片とした時、 β -ガラクトシダーゼ活性が種々の大きさの脊髄感覚ニューロンで検出された。図 2 b には、生後 2 日目の $\text{Na}_v 2^{+/-}$ マウスの脊髄神経節を X-Gal で染色したクリオスタット組織切片が示されている (参考写真 1 参照)。lacZ 発現は脊髄神経節のニューロン細胞体 (図 2 b 中、神経路が星印で示されている。) に限定されており、軸索からは検出されなかった。また、同じような lacZ 発現のパターンが三叉神経節の組織切片でも観察することができた。図 2 c には、胸部における成育した交感神経幹のクリオスタット切片が示されている (参考写真 1 参照)。強く染色された多くの細胞は、細胞体の出現、分布、サイズからして、シュワン (Schwann) 細胞であると考えられる。また、lacZ 発現は心臓自律神経及び舌神経でも観察された。lacZ 発現のこれらのパターンは、ラット $\text{Na}_v 2$ 及びマウス $\text{Na}_v 2$ 発現に関する結果 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7272-7276 (1992), FEBS Lett. 400, 183-187 (1997), Glia, 21, 269-276 (1997)) とよく一致する。このことから lacZ 遺伝子発現はマウス $\text{Na}_v 2$ 遺伝子の制御領域によって制御されていることがわかる。なお、図 2 c 中、矢頭はシュワン細胞の細胞体

を示し、スケールバーは50 μ mを表している。

【0048】

[N a_v2の生理学的な役割]

マウスN a_v2の生理学的な役割を調べるため、N a_v2^{+/-}マウスとN a_v2^{-/-}マウスの脳を用いて中枢神経系におけるl a c Z発現を調べた。生後間のない動物をペントバルビタール麻酔下において最初にP B Sでついで固定剤で灌流した。固定された脳を冠状に又は矢方向に2 mmの厚さにかみそりで切った。P B Sで2回洗浄し、1 m g / m l のX - G a l、5 m M のK₃F e (C N)₆、5 m M のK₄F e (C N)₆、2 m M のM g C l₂、0. 2 % のN P - 4 0 を含むP B S中で37℃において一晩インキュベートした。免疫染色のため、X - G a l染色された切片を冠状の14 μ mの切片にクリオスタットミクロトームで切り、ゼラチンで被覆されたスライド上に載置した。抗ニューロフィラメント200ウサギポリクローナル抗体 (Sigma、N - 4 1 4 2) 又は抗グリア原繊維酸性タンパク (G F A P) ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biochemistry、s c - 6 1 7 0) を用いて免疫染色した (Neurosci. Lett. 247, 135-138 (1998))。マウスN a_v2が成長個体の中枢神経系における特定のニューロン及び上皮細胞で発現していることを図3は示す (参考写真2参照)。

【0049】

図3 a - e はN a_v2^{+/-}マウスの、図3 f はN a_v2^{-/-}マウスの中枢神経系におけるl a c Z発現を示している。また、図3 a, b, d, e 及びf は固定された成長個体の脳を冠状に、図3 c は正中矢状面でそれぞれ2 mmに切断し、X - G a lで染色したものである。なお、図3 cにおいては脳の下頭蓋は除去しなかった。図3 eにおいて、ホモ接合変異体マウスが低レベル発現部位を検出する分析に用いられた。図3において、A H : 前方視床下部領域 (anterior hypothalamic area)、M H : 中央手綱核 (medial habenular nucleus)、M E : 正中隆起 (median eminence)、O V L T : 終板器官 (organum vasculosum laminae terminalis)、M P O : 中央視索前領域 (medial preoptic area)、D M H : 背中視床下部 (dorsomedial hypothalamus)、I P D M : 背中部位の脚間核 (interpeduncular nucleus of the dorsomedial part)、M M R : 正中縫線の中央部 (medial part

of the median raphe)、NHP : 神経下垂体(neurohypophysis)、SFO : 脳弓下器官(subfornical organ)、CX : 大脳皮質(cerebral cortex)、BLA : 扁桃体側低(basolateral amygdala)をそれぞれ意味する。図3 cにおいて、OVL Tは中枢神経系から除去され頭蓋に付けられた。冠状の半全量脳は50 μ mの厚さにクリオスタットミクロトームで切り、抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体(図3 g及びh)、抗GFAPポリクローナル抗体(図3 i)、又はクレシルバイオレット(cresyl violet)(図3 j)により染色された。茶色のシグナルは、抗体と反応した部位である。サンプルはAH(図3 g)、SFO(図3 h及びi)及びME(図3 j)である。矢頭はダブルポジティブニューロンを示す。図3 jの星印は、第三脳室を示す。背面はパネルの上方を向いている。図3 g-hのスケールバーは30 μ mであり、図3 jのスケールバーは100 μ mである。

【0050】

図3からわかるように、lacZ発現は中枢神経系の次の特定部位に限られていることが判明した(図3 a-f)。すなわち、MPO、AH、DMH、IPDM、MMR、MeV、MH、ME、SFO、OVL T及びNHPである。ME、SFO、OVL T及びNHPは脳室周囲器官(CVO)として知られ、高密度、高透過性の毛細血管ネットワークをもち、血中への物質の分泌や中枢組織への物質浸入を促進する(FASEB J, 7, 678-686(1993))。Na_v2^{+/-}マウスでは比較的弱いlacZの発現がCX及びBLAに見られたのに対し、Na_v2^{-/-}マウスにおけるこれらの部位でのlacZの発現はより顕著であった(図3 f)。lacZを発現している細胞種を調べるため、脳をX-Galで染色しクリオスタットミクロトームで組織切片に切り、ついで抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体又は抗グリア原繊維酸性タンパク(GFAP)ポリクローナル抗体で免疫染色するか、クレシルバイオレット染色を行ったところ、lacZ発現細胞の大部分はMPO、AH(図3 g)、IPDM、MMR、MH及びMeV中のニューロフィラメントに対して陽性であった。また、GFAP陽性細胞はlacZ発現に対して陰性であり、このことは星状膠細胞がマウスNa_v2に対し陰性であることを示している。

【 0 0 5 1 】

C V Oにおける l a c Z発現細胞の分布は特に重要であり、M Eにおける l a c Z発現細胞は第3脳室の床に並んでいた(図3 j)。この分布は線毛を持たない上皮細胞の位置と対応している。この細胞は脳脊髄液(C S F)、神経細胞及び血管の間を結合している特殊な細胞であるタニサイトと考えられる(Neuroscience 3,277-283(1978))。これらはC S Fと毛細管周縁空間の間の物質交換に関与していると考えられている。l a c Z陽性細胞はS F O全体に亘ってまばらに分布し、その大部分はニューロフィラメントと共在し(図3 h)、G F A Pに対し陰性であった(図3 i)。l a c Z陽性細胞は第3脳室の全体に並んで集中的に存在し、これが上皮細胞であることを示唆している。N H Pには、X - G a lで密に染色された。これらはいわゆる下垂体細胞(J.Exp.Biol.139,67-79(1988))に対応すると思われる。

【 0 0 5 2 】

[F o s - イムノ組織化学]

l a c Z発現の解析によって、マウスN a_v2は4つの脳周囲器官及び中枢神経系のいくつかの神経核において発現することや、マウスN a_v2発現細胞は組織分布のみならず細胞タイプにおいても多様性があることが判明したことから、N a_v2チャンネルの機能、特性の決定が困難となったが、4つの脳周囲組織が体液ホメオスタシスに関与していると考えられていることから(FASEB J 7,678-686(1993)、Annu.Rev.Physiol.59,601-619(1997)、Physiol.Rev.78,583-686(1997)、Physiol.Rev.58,582-603(1978)、Ann.NY Acad.Sci,877,258-280(1999))、マウスN a_v2チャンネルが体液容量オスモル濃度の感覚経路において機能していると仮定すれば、これらの器官におけるそのチャンネルの活性と遺伝子発現はマウスN a_v2変異体マウスにおいて影響を受けると想定された。そこで、マウス及びラットにおける細胞外液バランスに応じた神経活動の変化のマーカーであるF o s核タンパクの中枢性発現に対して、水分飢餓がどのように影響するかを以下のように調べた。

【 0 0 5 3 】

水分充足状態及び水分飢餓状態におかれた、脳の中央視索前核(M n P O)、

終板器官 (OVLT)、脳弓下器官 (SFO)、室旁核 (PVN) 及び視索上核 (SON) の5つの領域における Fos-イムノポジティブ細胞の密度変化 (時間に対する) について、水欠乏時間がゼロのマウス (マウス $Na_v2^{+/+}$ につき $n=4$ 、マウス $Na_v2^{-/-}$ につき $n=4$)、水欠乏12時間のマウス ($n=5$ 及び 5)、同24時間のマウス ($n=6$ 及び 7)、同48時間のマウス ($n=6$ 及び 5) を用いて調べた。前記固定液で灌流したマウスの脳を同じ固定液に 4°C で一夜浸漬した後、脳をビブラトーム (Leica, VT1000S) 上で $50\mu\text{m}$ の厚さの冠状切片とした。抗 Fos ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biochemistry, sc-52-G) の PBS 1000 倍希釈液を用いてイムノ染色した。関連する領域を含む切片を選び、Fos-イムノ陽性核を数えた。各領域はイメージ分析システム (KS400 が付属した Axio phot 2) を用いて測定した。上記脳の5つの領域 1mm^2 当たりの核の数を測定した。結果を図4に示す (参考写真3 参照)。

【0054】

図4 a は、水分充足状態又は24時間水分飢餓状態の野生型 (+/+) マウス及びヌル変異体 (-/-) マウスの終板器官 (OVLT) 含有組織切片の典型的な像であり、スケールバーは $200\mu\text{m}$ を示している。また図4 b は、水分飢餓状態における脳弓下器官 (SFO)、視索上核 (SON)、室旁核 (PVN)、終板器官 (OVLT) 及び中央視索前核 (MnPO) 1mm^2 当たり中の Fos-イムノポジティブ細胞の数 (平均) をプロットしたものであり、図中の縦棒は S. E. を示し、星印は $Na_v2^{-/-}$ マウスと $Na_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差 ($p<0.05$) が認められることを示している。水分充足条件下においては、Fos-イムノポジティブ細胞はテストしたどの領域においても検出されなかった。水分飢餓12、24 及び48時間条件下において Fos-イムノポジティブ核を有する細胞数は、 $Na_v2^{-/-}$ マウスでも $Na_v2^{+/+}$ マウスでも顕著に増加した。しかし、SFO 及び OVLT における $Na_v2^{-/-}$ マウスにおける Fos-イムノポジティブ核は、 $Na_v2^{+/+}$ マウスに比べ2倍増加することが観察された。MnPO、PVN、及び SON においてはグループ間に差はなかった。

【0055】

[行動解析]

次いでマウス $\text{Na}_v 2$ チャネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響を調べた。行動解析を行うにあたって変異体マウスを雄の C57BL/6J と戻し交配させた。その結果、F1 マウスと N4 マウスで同様の結果を得た。ホモ接合型、ヘテロ接合型、野生型の同腹子における嗜好－嫌悪行動を、48 時間 2 瓶嗜好性試験によって測定した。マウスは蒸留水と味溶液の選択を 48 時間自己のケージで行った。全ての行動解析には 12-24 週令の雄のマウスが使われた。マウスは一定の室温、湿度及び 12/12 時間明－暗サイクルにおいて各別にケージに入れられた。2 つの瓶の位置は 24 時間毎に代えてサイド嗜好性の影響を回避した。動物毎の総摂取量を測定し、式；嗜好率 = 味溶液の量 (ml) / 味溶液及び水の総摂取量 (ml) により嗜好性を計算した。結果を図 5 に示す。図 5 a は段階的濃度の食塩水、図 5 b は濃度固定の 3 種類の基本的な味物質についての結果を示し、ホモ接合型(-/-)、ヘテロ接合型(+/-)、野生型(+/+)とも 5 匹のマウスを用いた。図 5 a から、水分及び食塩充足条件下では食塩に対する濃度感受性は 3 つのグループにおいて変わらず、全てのグループにおいて 0.1 M の NaCl を最も好み、0.3 M 又はそれ以上の濃度に対し嫌悪を示し、ヌル変異体が水分及び食塩が充足した条件下では各種の味物質に対して正常な嗜好を示すことがわかった。また図 5 b から、甘味 (0.5 M の蔗糖)、酸味 (0.01 M の HCl)、苦味 (0.02 M のキニン塩酸塩) に対する嗜好性に差が無いことがわかる。

【0056】

[電気生理学]

ヌル変異体の味反応の正常性を調べるため、 NaCl 味をつかさどる鼓索神経に関する電気生理学的分析を行った。12-24 週令の雄マウス (正常条件のために野生型 4 匹とホモ接合型マウス 5 匹；急性食塩欲求条件のための上記マウス 3 匹及び 5 匹) にペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg) を腹腔内投与して深く麻酔した後に各マウスを気管切開し、頭保持具で固定した。鼓索神経を露出させて周囲の器官から隔離させ、ブラ (bulla) の入口部位で切断した。神経の全束を切断し白金ワイヤー記録電極上 (0.1 mm 直径) に持ち上げた。

中性電極を近傍の組織に付けた。神経活動は増幅され、オシロスコープに表示され、オーディオアンプリファイアーでモニターされた。増幅された信号は時間定数0.3秒で積分機に通され、スリップチャート記録計上に表示された。

【0057】

味溶液としては0.1Mの NH_4Cl 、0.1Mの NaCl 、0.5Mの蔗糖、0.01Mの HCl 、0.02Mのキニン塩酸塩 (Q-HCl)、0.1Mの KCl 及び0.1Mの CH_3COONa (AcNa)を用いた。これらの溶液は蒸留水及び0.1mMのアミロライド溶液を用いて作られた。各溶液及び洗浄水は室温 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) において舌の前面に適用された。舌は連続刺激の間に少なくとも45秒洗浄された。全神経反応は刺激開始10秒後における基線からの総和反応の高さとして測定された。各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の記録結果を図6aに示す。また、0.1Mの NH_4Cl に対する鼓索神経における反応を1とした場合の各種の味刺激に対する反応の強さを図6bに示す。

【0058】

0.02Mのキニン塩酸塩及び0.1Mの酢酸ナトリウムに対する神経生理学的反応は、ヌル変異体マウスと野生型マウスの間で同じ強さであった。0.1Mの NaCl 及び0.1Mの酢酸ナトリウムに対する反応はアミロライドによって両グループとも同じように減少したので、変異体マウスの味蕾におけるアミロライド感受性チャネルは正常に機能していると判断される。急性食塩欲求条件下でヌル変異体及び野生型マウスは同じような結果を示した。これらの知見を、水及び食塩充足条件下における各種味物質に対する正常な反応 (図5) と併せ考えれば、ヌル変異体の味覚受容体は障害を受けていないことがわかる。

【0059】

水分飢餓条件下では高張状態を脱するために、動物は大量の水分を摂取し高張食塩水の摂取を避ける。次に24時間水分飢餓の前後における高張食塩水 (0.3Mの NaCl) に対する嗜好を調べた。試験に先立ちマウスは2つの瓶から水を飲むように1週間訓練された。水分欠乏の1日前の10時に水と0.3Mの NaCl の選択を与え、16時に液摂取量を測定した。翌日10時に両方の瓶を除き、水分飢餓期間中乾燥飼料が与えられた。24時間水分飢餓の後、両方の瓶を

戻し液摂取量を16時に測定した。結果を図7に示す。ヌル変異体は水分不足状態で高張食塩水の異常摂取を示した。24時間水分飢餓の前後において0.3MのNaClに対する嗜好率(図7a)と総摂取量(図7b)を測定した。この実験におけるn数(匹)は、6(+/+), 6(+/-), 6(-/-)であり、図中の縦棒はS.E.を示し、*印は $\text{Na}_v 2^{-/-}$ マウスと $\text{Na}_v 2^{+/+}$ マウスの間で有意差($p < 0.05$)が認められることを表している。水分飢餓の後には高張食塩水に明らかに低下した嗜好を示した野生型及びヘテロ接合型マウスと異なり、ヌル変異体マウスは嗜好率において変化が無かった(図7a)。総水分摂取量(水と0.3MのNaClの合計)は24時間水分飢餓の前後で変わらなかった。総水分摂取量は全てのグループが水分飢餓後には4倍以上となっていた(図7b)。

【0060】

また、水分飢餓処理の前後における血液を断頭術により回収し、血漿電解質の濃度を電解質分析器(9180、AVL Scientific, GA)によって測定した。水分飢餓の前後における血清中の電解質濃度は、野生型及びホモ接合型マウス(各 $n=6$)の両方で正常であった。野生型及びホモ接合型マウスにおける水分飢餓処理前の Na^+ 濃度(mM)はそれぞれ 153.6 ± 0.6 及び 153.0 ± 1.2 、 K^+ 濃度(mM)はそれぞれ 4.6 ± 0.1 及び 4.7 ± 0.1 、 Cl^- 濃度(mM)はそれぞれ 118.5 ± 0.6 及び 118.3 ± 0.9 であった。また、水分飢餓処理後の Na^+ 濃度(mM)はそれぞれ 151.6 ± 0.8 及び 150 ± 0.3 、 K^+ 濃度(mM)はそれぞれ 6.5 ± 0.2 及び 6.7 ± 0.2 、 Cl^- 濃度(mM)はそれぞれ 116.0 ± 1.0 及び 116.4 ± 0.8 であった。これらのデータは、ヌル変異体は過剰量のナトリウムを直ちに尿中に排泄し、腎臓機能が正常であることを示している。

【0061】

更に利尿剤であるフロセミドを腹腔内注射する方法及び食塩欠乏食を与える方法で食塩欲求を誘導し、ナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験を次の方法で行った。試験の前に水及び0.3MのNaCl摂取の対照測定を数日間にわたり行った。10時に0.12mlの通常食塩水(0.9%のNaCl)をマウス腹腔内に注射した。0.3MのNaClの瓶を取り除き、ナトリウム欠乏食を通常

食の代わりに与えた。16時に通常食塩水の2回目の注射をした。その次の日の10時に水及び0.3MのNaClを与え12時、14時、16時に水及び0.3MのNaClの摂取量を測定した。その後同様なプロトコールで、同じマウスにより、フロセミド注射（0.12mlの通常食塩水中に0.6mg含有）、ナトリウム欠乏食でテストした（急性食塩欲求状態）。最後に通常のナトリウム含有食を与える点のみを変更したプロトコールによりナトリウム欠乏食の効果を評価した。結果を図8に示す。

【0062】

図8には、摂取された水及び0.3MのNaCl量が2時間毎の蓄積量として示されている。図8の上段にはナトリウムの無い食餌を通常食塩水注射と組み合わせた結果が、中段にはナトリウムの無い食餌をフロセミド注射と組み合わせた結果が、下段にはナトリウムを含む食餌をフロセミド注射と組合せた結果が、実験処理直後から2時間毎の0.3MのNaCl（右側）及び水（左側）の蓄積合計摂取量の平均値プロットとして示されている。この実験のn数（匹）は10（+/+）、10（+/-）、10（-/-）であり、図8中の縦棒はS.E.を示し、*印は $\text{Na}_v2^{-/-}$ マウスと $\text{Na}_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差（ $p < 0.05$ ）が認められたことを表している。図8からもわかるように、フロセミドの代わりに等張食塩水を腹腔内注射した場合（対照試験）に摂取した水及び0.3MのNaClの量はどのグループも同じであった（上段のグラフ）。フロセミド注射とナトリウム欠乏食によって誘導した急性食塩欲求条件下ではヌル変異体は野生型及びヘテロ接合型と比べて0.3MのNaCl摂取量の増加は約2倍であった（中段右のグラフ）。この異常な高張食塩水の摂取はナトリウム含有食を与えた場合には止まった（下段のグラフ）。

【0063】

[Na_v2 チャネルはナトリウム濃度依存性ナトリウムチャネル]

Na_v2 チャネルがナトリウム濃度依存性ナトリウムチャネルであることを以下の実験により確認した。

まず、抗 Na_v2 抗体を次のようにして作製した。ラット Na_v2 チャネルのインタードメイン2-3に存在するアミノ酸配列（SVSETVP IASGES

DIK ; 配列番号 8) からなるペプチドにヘモシアニンを結合させ、このヘモシアニン結合ペプチドを免疫原として白色ウサギを免疫し、常法により抗ラット Na_v2 ウサギ抗血清を作製した。作製した抗血清を、免疫原に用いたペプチドが固定化されたカラムによって精製し、抗 Na_v2 抗体を得た。この抗 Na_v2 抗体の特異性はウエスタンブロットと免疫組織化学的解析によって確認した。精製した抗 Na_v2 抗体を使用すると、遺伝子欠損マウスから作製した脳、肺、脊髄後根神経節、舌の切片には非特異的な陽性シグナルは認められなかった。

【0064】

次に、脊髄後根神経節の神経細胞を単離した。脊髄後根神経節を 8～16 週令の野性型マウス及び Na_v2 遺伝子欠損型マウスから調製した。Renganathanらの方法 (J Neurophysiol 84, 710-718, 2000) に従って、脊髄後根神経節から神経細胞を分散単離した。イオンイメージング実験に用いる前に、分散単離した神経細胞は、湿度 100%、温度 37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養し、培養皿のガラスに接着させた。野性型マウス由来の脊髄後根神経節の神経細胞を、上記抗 Na_v2 抗体を用いて染色することにより、すべての神経細胞が Na_v2 陽性であることを確認した。また、分散単離した神経細胞の大きさは、小型 (直径 25 ミクロン以下 : 約 50%)、中型 (直径 25 から 40 ミクロン : 約 40%)、大型 (直径 40 ミクロン以上 : 約 10%) から構成されていたが、これら三つの細胞種の大きさ、形状、生存率は、野性型マウスから単離したものと遺伝子欠損型マウスから単離したものも違いはなかった。なお、生存率については、トリパンブルーの染色によって検証した。

【0065】

また、脳弓下器官の神経細胞についても単離した。脳弓下器官を 8～16 週令の野性型マウス及び Na_v2 遺伝子欠損型マウスから調製した。脳弓下器官を可視化するためにエバンスブルーを前もって腹腔内に注入した。脳弓下器官の分散は、Jurzakらの方法 (Brain Res 662, 198-208, 1994) に従って行った。分散単離した神経細胞は、脊髄後根神経節の神経細胞の場合と同様に、湿度 100%、温度 37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養し、培養皿のガラスに接着させ、実験に用いた。野性型マウス由来のいくつかの脳弓下器官の神経細胞を、上記抗 Na_v2

$\text{Na}_v 2$ 抗体を用いて染色したところ、 $\text{Na}_v 2$ 陽性神経細胞は 20～30%であった。なお、野性型マウスから単離した神経細胞と遺伝子欠損マウスから単離した神経細胞とは、大きさや生存率においても違いはなかった。

【0066】

上記野性型マウス及び $\text{Na}_v 2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した、脊髄後根神経節の神経細胞や脳弓下器官の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの測定を実施した。細胞内ナトリウムイオンの測定には、SBFI/AM (sodium-binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester) を用い、細胞内カルシウムイオンの測定には、Fura-2/AMを用いた。これらの指示薬をロードした培養細胞を付着させた培養皿を顕微鏡のステージに固定した。蛍光比 (F_{340}/F_{380}) は蛍光イメージングシステムによってモニターした。データ測定のため、脊髄後根神経節の神経細胞については10秒毎に、また脳弓下器官の神経細胞については20秒毎に、それぞれサンプリングした。測定する前に、神経細胞は生理的な等張液 (145 mMの細胞外ナトリウム濃度) で30～60分間インキュベートし、測定中、神経細胞は一定の環流液 (5 mMのKCl、2.5 mMの CaCl_2 、1 mMの MgCl_2 、10 mMのHEPES、10 mMのNaOH、所定濃度のNaCl、pH 7.4 (HClによる中和) に暴露し、環流液 (細胞外液) は室温下一定流速 (1 ml/min) で環流した。

【0067】

脊髄後根神経節の神経細胞における蛍光比 (F_{340}/F_{380}) の蛍光イメージング結果を図9 (参考写真4 参照) 及び図10に示す。図9からわかるように、細胞外NaCl濃度を145～170 mMに上昇させると、野性型マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞の細胞内ナトリウムイオン濃度は急激に上昇し、そのまま定常状態に達したが、これに対し、遺伝子欠損マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞では、野性型マウスにおけるような細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は全く観察されなかった (図9 a と b)。また、野性型マウス由来脊髄後根神経節の神経細胞内ナトリウムの上昇は、すべての大きさの神経細胞で観察された (図9 c)。これは $\text{Na}_v 2$ が全ての野性型マウスの脊髄後根神経節の神経細胞

に発現することと一致する。

【0068】

また図10からわかるように、細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は、マンニトールを用いた浸透圧刺激や塩化コリンを用いた塩素イオン単独の刺激ではおこらず、メタンスルホン酸ナトリウムを用いたナトリウムイオン単独の刺激によって引き起こされた(図10a)。よってこの現象はナトリウムイオン濃度の上昇によってのみ引き起こされることがわかった。また、塩化ナトリウムを用いて、細胞外ナトリウム濃度を120、130、140、150、160、165、170、180、190、200 mMの10段階に調整し、細胞内ナトリウムイオン濃度の変化を解析したところ120~150 mMの間では全く反応が無く、160と165 mMの細胞外ナトリウムイオン濃度で上昇が観察され、170 mM以上の細胞外ナトリウムイオン濃度では、非常に大きな上昇が観察された(図10b)。このとき、細胞外ナトリウムを元の145 mMに戻すと、徐々に細胞内ナトリウム濃度は元に戻っていく様子が観察された。細胞内のナトリウムストアは存在しないことから、この細胞内ナトリウム濃度の上昇は、 Na_v2 チャネルを介した細胞外からの流入であると結論した。また、そのチャネル開口の閾値は160~170 mMの間にあると推察できる。

【0069】

この細胞外ナトリウムイオン濃度の上昇に伴う細胞内へのナトリウムの流入に Na_v2 チャネル以外の分子が関与している可能性を検討するために、各種ナトリウムイオンポンプ、ナトリウムイオントランスポーター、ナトリウムイオンチャンネルの各ブロッカーの効果を調べた。その結果、TTX感受性の電位依存性ナトリウムチャンネル(図10c)、アミロライド感受性ナトリウムチャンネル(図10c)、ナトリウムグルコースコトランスポーター、ナトリウムカルシウムアンチporter、ナトリウムカリウムクロライドトランスポーター、ナトリウムカリウムポンプの影響はないことがわかった。また、TTX非感受性の電位依存性ナトリウムチャンネルは、小型の脊髄後根神経節の神経細胞に特異的に発現しているため、全ての大きさの細胞種に反応が見られるこの現象には関与していないと結論した。ナトリウムカルシウムアンチporterに関しては、カルシウムイメ

ージングによっても関与が無いことを確かめた（図 1 0 d）。

【 0 0 7 0 】

脳弓下器官の神経細胞における蛍光比（F 3 4 0 / F 3 8 0）の蛍光イメージング結果を図 1 1（参考写真 5 参照）に示す。図 1 1 からわかるように、中枢神経系のナトリウムイオン濃度検出器官である脳弓下器官の神経細胞においても、脊髄後根神経節の神経細胞と基本的に同様の結果が得られた。ただし、脳弓下器官の神経細胞のうち約 2 0 から 3 0 % の細胞が、N a_v2 免疫陽性細胞であり、これら N a_v2 免疫陽性細胞は細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇が観察されたが、N a_v2 免疫陰性細胞では、N a_v2 遺伝子欠損型マウスと同様に、細胞内ナトリウムイオン濃度の上昇は観察されなかった。これらのことから、脳弓下器官においても N a_v2 は、細胞外ナトリウムイオン濃度に依存して細胞内にナトリウムイオンを流入させるナトリウムチャンネルであることが証明できた。すなわち、N a_v2 はナトリウム濃度依存性ナトリウムチャンネルという新規ナトリウムチャンネルであることがわかった。

【 0 0 7 1 】

【発明の効果】

本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば N a_v2 チャンネル遺伝子欠損マウスは、塩分過剰摂取実験モデル動物として有用である。またこの N a_v2 チャンネル遺伝子欠損マウスを用いることにより、N a_v2 チャンネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることや、N a_v2 チャンネルが中枢神経系の限られた部位におけるニューロンや上皮細胞、特に体液ホメオスタシスに関与する脳室周囲器官で発現することや、N a_v2 チャンネルが体液オスモル濃度知覚と食塩摂取行動の制御に重要な役割を果していることが明らかとなった。

【 0 0 7 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by Director General of Okazaki National Research

Institutes

<120> Nav2 channel gene-deficient non-human animals

<130> U2001P059

<140>

<141>

<150> JP 2000/237320

<151> 2000-08-04

<150> JP 2000/241637

<151> 2000-08-09

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 446

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

atgttgactt cccagagcc gaagggcctt gtccattca cggcagagtc acttgaactt 60
ataaaaaatc acattgctaa aaaatgcaac gaagagcatg aagaagaaga tttaaaacca 120

agccgggata tagaagcagg caaaaaactt ccatttgcct atggaaccct tcctcaagga 180
 accgtgtcag agcccttggga agatgtggat ccatactact atgttaagag aaatactttc 240
 atgggtcttaa acagaaacag agtcactctt aggttcaatg cggtttccat cctctgcacg 300
 ttgtctcctt taagctctct cagaagagct gttatcaagg ttttgggtgca ccccttttg 360
 cgcctgctga ttttaattag tgttctcacc gacagcatat ttatgtgcat gagtaaccta 420
 ccggaatgga tattggcagt agagaa 446

<210> 2

<211> 5482

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(5297)

<400> 2

cacgcgtcga ctagtacggg ggggggggag gggttggtct gtaggtggtc tctgggtctg 60
 tggagctagc ctggtggctg agtgtttagc tggaagcagc agtggaccgc aaccacattg 120
 caacaacctc cgtagtagag atctgagaag acaagcccag gagagcaaag ggctctcgtg 180
 agccttgcac ctggggttct tgctggagtt ttagtgaaga ctagcatttg acagcaacta 240
 taaaaccgaa a atg ttg act tcc cca gag ccg aag ggc ctt gtc cca ttt 290

Met Leu Thr Ser Pro Glu Pro Lys Gly Leu Val Pro Phe

1

5

10

aca aca gag tca ctt gaa ctt ata gaa aat cac att gct aaa aaa tgc 338

Thr Thr Glu Ser Leu Glu Leu Ile Glu Asn His Ile Ala Lys Lys Cys

15

20

25

aat gaa gac ccc gaa gaa gaa gaa ggt tta aaa cca agt cgt aat cta 386

Asn Glu Asp Pro Glu Glu Glu Glu Gly Leu Lys Pro Ser Arg Asn Leu

30

35

40

45

gaa gct ggc aaa aga ctt cca att ccc tat gga acc ctc cct cga gga 434

Glu Ala Gly Lys Arg Leu Pro Ile Pro Tyr Gly Thr Leu Pro Arg Gly

50

55

60

acc gtg tca gag ccc ttg gaa gat gtg gat cca tac tac tat gtt aag 482

Thr Val Ser Glu Pro Leu Glu Asp Val Asp Pro Tyr Tyr Tyr Val Lys

65

70

75

aga aat act ttc atg gtc tta aac aga agc aga gtc atc ttc agg ttc 530

Arg Asn Thr Phe Met Val Leu Asn Arg Ser Arg Val Ile Phe Arg Phe

80

85

90

aat gcg gtt tcc atc ttc tgc aca ttg tct cct cta aac tcc ctc aga 578

Asn Ala Val Ser Ile Phe Cys Thr Leu Ser Pro Leu Asn Ser Leu Arg

95

100

105

aga gca gct atc aag gct ttg gtg cat ccc ctt ttt cgc ctg ctg att 626

Arg Ala Ala Ile Lys Ala Leu Val His Pro Leu Phe Arg Leu Leu Ile

110

115

120

125

tta atc agc gtt ctc act gac agc ata ctt atg tgc atg agt aat cta 674
 Leu Ile Ser Val Leu Thr Asp Ser Ile Leu Met Cys Met Ser Asn Leu
 130 135 140

cca gaa tgg ata ttg gca ata gag aat act ttg ctt ggg att tac gca 722
 Pro Glu Trp Ile Leu Ala Ile Glu Asn Thr Leu Leu Gly Ile Tyr Ala
 145 150 155

ttt gaa ata ctt gta aaa gtc att gca aga ggt atc tgg gca ggt tca 770
 Phe Glu Ile Leu Val Lys Val Ile Ala Arg Gly Ile Trp Ala Gly Ser
 160 165 170

ttt tcc ttc ctt ggg gat ctt tgg aac tgg ctt gat ttc agt gta act 818
 Phe Ser Phe Leu Gly Asp Leu Trp Asn Trp Leu Asp Phe Ser Val Thr
 175 180 185

ttg ttc gag cta atc aca agg ttt tca cct cta agc tcc ttt tta atg 866
 Leu Phe Glu Leu Ile Thr Arg Phe Ser Pro Leu Ser Ser Phe Leu Met
 190 195 200 205

ctt aaa act atc aga act ttc cga att ttg aag att atc cct ttg aac 914
 Leu Lys Thr Ile Arg Thr Phe Arg Ile Leu Lys Ile Ile Pro Leu Asn
 210 215 220

cac ggc ctg cag tct att gtg atg aca ctg gcc cag tgt ttg aag aaa 962
 His Gly Leu Gln Ser Ile Val Met Thr Leu Ala Gln Cys Leu Lys Lys
 225 230 235

cta ttt ggt gcc att gcc cta gct ctg ttt ttt ctg gct gtg ttt tca 1010

Leu Phe Gly Ala Ile Ala Leu Ala Leu Phe Phe Leu Ala Val Phe Ser

240

245

250

cta ctt gga atg ggc ctc ttc atg ggc aac ctg aag cac aaa tgt ctg 1058

Leu Leu Gly Met Gly Leu Phe Met Gly Asn Leu Lys His Lys Cys Leu

255

260

265

cgg tgg cca gaa gaa aat gaa aat gaa acg ctg cac aac aga act gga 1106

Arg Trp Pro Glu Glu Asn Glu Asn Glu Thr Leu His Asn Arg Thr Gly

270

275

280

285

agc ctt aac tat agt cca gaa aga ata aac ttc tac tac atg gaa gga 1154

Ser Leu Asn Tyr Ser Pro Glu Arg Ile Asn Phe Tyr Tyr Met Glu Gly

290

295

300

gcg aaa tat gct ctc ctt tgc ggc aac agg aca gat gct ggc cag tgt 1202

Ala Lys Tyr Ala Leu Leu Cys Gly Asn Arg Thr Asp Ala Gly Gln Cys

305

310

315

ccg gaa ggt tat gtg tgt gta aaa gaa ggc aca aat cct gac aat ggc 1250

Pro Glu Gly Tyr Val Cys Val Lys Glu Gly Thr Asn Pro Asp Asn Gly

320

325

330

ttc aca agt ttt gac aac ttt ggc tgg tcc ctt ctt gct atg ttt cga 1298

Phe Thr Ser Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Leu Leu Ala Met Phe Arg

335

340

345

ttg atg aca cag gat tac cct gaa tta ctt tat cac cag atc ctt tat 1346

Leu Met Thr Gln Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Tyr His Gln Ile Leu Tyr

350	355	360	365	
gct tca gga aag gtc tac atg ata ttt ttt gtt atg atc agt ttc tgg				1394
Ala Ser Gly Lys Val Tyr Met Ile Phe Phe Val Met Ile Ser Phe Trp				
	370	375	380	
ttt gcc ttc tat ttg aca agt ttg ttc ttg ggc ata ctc act atg acc				1442
Phe Ala Phe Tyr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Thr				
	385	390	395	
tat gaa aag gaa aag cag aga gcc tgt gag gaa tct gga ggc ctt gat				1490
Tyr Glu Lys Glu Lys Gln Arg Ala Cys Glu Glu Ser Gly Gly Leu Asp				
	400	405	410	
ccc aaa tgt caa cag aca gtg aaa gaa ctc gac gaa gaa aat gac gca				1538
Pro Lys Cys Gln Gln Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Glu Asn Asp Ala				
	415	420	425	
gct gag atg gaa act aca caa ata gaa atg aag aaa aga tcc cca act				1586
Ala Glu Met Glu Thr Thr Gln Ile Glu Met Lys Lys Arg Ser Pro Thr				
430	435	440	445	
tct ata aac acc aca ctg gat ata ctg gaa gac act acc ctc gga cac				1634
Ser Ile Asn Thr Thr Leu Asp Ile Leu Glu Asp Thr Thr Leu Gly His				
	450	455	460	
aga gaa gaa cca gaa aca tcc agg aag aaa tgc cca ata tgt tgg cat				1682
Arg Glu Glu Pro Glu Thr Ser Arg Lys Lys Cys Pro Ile Cys Trp His				
	465	470	475	

aag ttt att aaa acc tgc ttc atc tgg aaa tgc tct ccc tgt tgg gta 1730

Lys Phe Ile Lys Thr Cys Phe Ile Trp Lys Cys Ser Pro Cys Trp Val

480

485

490

aaa ctg aac gag ttt gct gat aga gtt ata aca cac cca ttg gct gat 1778

Lys Leu Asn Glu Phe Ala Asp Arg Val Ile Thr His Pro Leu Ala Asp

495

500

505

ctt ttt ctt gtc atc tgc atc gtt tta aac ata tgc ttc ctc gcc cta 1826

Leu Phe Leu Val Ile Cys Ile Val Leu Asn Ile Cys Phe Leu Ala Leu

510

515

520

525

gaa cat ttt cca atg agc gag gag ctc agg tct ctc ctt cac gtt gga 1874

Glu His Phe Pro Met Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Leu His Val Gly

530

535

540

aat ttg gtt ttt att gga att tac aca ata gaa ctg att ttg aag ata 1922

Asn Leu Val Phe Ile Gly Ile Tyr Thr Ile Glu Leu Ile Leu Lys Ile

545

550

555

atc gct atg cat cca tat ggg tat ttt caa ata agc tgg aat att ttt 1970

Ile Ala Met His Pro Tyr Gly Tyr Phe Gln Ile Ser Trp Asn Ile Phe

560

565

570

gac agt ata ctt gtg gtt ttg gag tta aca gaa att tta cta gca gat 2018

Asp Ser Ile Leu Val Val Leu Glu Leu Thr Glu Ile Leu Leu Ala Asp

575

580

585

gtt gaa gga cta gct gtt tta ata aca gtc cca ttg ata ttt ata aaa 2066
Val Glu Gly Leu Ala Val Leu Ile Thr Val Pro Leu Ile Phe Ile Lys
590 595 600 605

ctg ggg aag tac gga cca cca ttt aag agt ttg atg cgc atc ctt ggt 2114
Leu Gly Lys Tyr Gly Pro Pro Phe Lys Ser Leu Met Arg Ile Leu Gly
610 615 620

agc tca ttg atg gcc ctg aaa gat ttg gtc ctg ttg ctc tgc ata ttc 2162
Ser Ser Leu Met Ala Leu Lys Asp Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Phe
625 630 635

gtt tac ttc tct gct gtg ttc ggc atg aag ctg ttt ggt cga agt tac 2210
Val Tyr Phe Ser Ala Val Phe Gly Met Lys Leu Phe Gly Arg Ser Tyr
640 645 650

aag gat tgt gtc tgc cac ata aag gaa gac tgc caa ccc caa cgc tgg 2258
Lys Asp Cys Val Cys His Ile Lys Glu Asp Cys Gln Pro Gln Arg Trp
655 660 665

cac atg agt gac ttc ctt cat gcc tac atg acc gtg ttc cga atc ctc 2306
His Met Ser Asp Phe Leu His Ala Tyr Met Thr Val Phe Arg Ile Leu
670 675 680 685

tgt gga gag tgg ata gag aca tta tgg gag tgt atg gag gtt gca ggc 2354
Cys Gly Glu Trp Ile Glu Thr Leu Trp Glu Cys Met Glu Val Ala Gly
690 695 700

cag gcc tgg tgt att cct ttt tac atg atg gtc att tta att gga aac 2402

Gln Ala Trp Cys Ile Pro Phe Tyr Met Met Val Ile Leu Ile Gly Asn

705

710

715

tta ttg ata ctt tac ctc ttt gtg aca ttg gtg agc tct ttc agt tac 2450

Leu Leu Ile Leu Tyr Leu Phe Val Thr Leu Val Ser Ser Phe Ser Tyr

720

725

730

tat gat gct aca tcg gaa gtg aac aaa gaa gcc aaa aac ctt cag ctt 2498

Tyr Asp Ala Thr Ser Glu Val Asn Lys Glu Ala Lys Asn Leu Gln Leu

735

740

745

gcc atg gca agg ata aag tcg gga ata aac tcc atg ctt ctt aaa tta 2546

Ala Met Ala Arg Ile Lys Ser Gly Ile Asn Ser Met Leu Leu Lys Leu

750

755

760

765

atg tgc aca gaa aga agt gtt cct aca gaa gca aca gac caa ata tgt 2594

Met Cys Thr Glu Arg Ser Val Pro Thr Glu Ala Thr Asp Gln Ile Cys

770

775

780

gat cca agt gtt aaa gag aat att tct ggc cat act ctt tct gaa ctg 2642

Asp Pro Ser Val Lys Glu Asn Ile Ser Gly His Thr Leu Ser Glu Leu

785

790

795

agc aac acc caa act ttc ctc aga tat aag gac cag agc agc agc act 2690

Ser Asn Thr Gln Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Asp Gln Ser Ser Ser Thr

800

805

810

gag aaa act cca gtg act gaa tct gag agt caa tct ctg att gct agt 2738

Glu Lys Thr Pro Val Thr Glu Ser Glu Ser Gln Ser Leu Ile Ala Ser

815	820	825	
ccc agt gcc tct gaa act gtg ccg att gct tca gga gaa tct gat ata			2786
Pro Ser Ala Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile			
830	835	840	845
gaa aat ctg gat aac aag gag act cgg agc aag tct ggg aat gga ggc			2834
Glu Asn Leu Asp Asn Lys Glu Thr Arg Ser Lys Ser Gly Asn Gly Gly			
	850	855	860
agt aaa gag aaa atg aag cag tct agc tca tct gag tgc agc aca gtt			2882
Ser Lys Glu Lys Met Lys Gln Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val			
	865	870	875
gat atc gct att tct gaa gaa gaa gaa atg gtc tat gaa cat gaa aag			2930
Asp Ile Ala Ile Ser Glu Glu Glu Glu Met Val Tyr Glu His Glu Lys			
880	885	890	
tca aag ctt cat aaa aat ggt tat gaa cgc aaa tct tca act ggt caa			2978
Ser Lys Leu His Lys Asn Gly Tyr Glu Arg Lys Ser Ser Thr Gly Gln			
895	900	905	
atc agt aga gaa tct agg aat gga aag att tgg aaa aac atc agg aaa			3026
Ile Ser Arg Glu Ser Arg Asn Gly Lys Ile Trp Lys Asn Ile Arg Lys			
910	915	920	925
act tgc tgc aag ata gta gag aac agc tgg ttt gag tgt ttc att ggc			3074
Thr Cys Cys Lys Ile Val Glu Asn Ser Trp Phe Glu Cys Phe Ile Gly			
	930	935	940

ctg gtc act ctg ctc tgc aca ggc act ctg gct ctt gaa gac ata tat 3122
Leu Val Thr Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr

945

950

955

att gat cag aga aaa acc act aaa atc tta ctg gaa tat gcg gac atg 3170
Ile Asp Gln Arg Lys Thr Thr Lys Ile Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Met

960

965

970

ata ttt gca tac atc ttc att ctg gag atg ctt ctc aag tgg gtg gct 3218
Ile Phe Ala Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala

975

980

985

tat ggc ttt aaa gcc ttt ttc tcc aac aac tgg tac aaa ctg gac ttt 3266
Tyr Gly Phe Lys Ala Phe Phe Ser Asn Asn Trp Tyr Lys Leu Asp Phe

990

995

1000

1005

atg gtt gtt atc gtg ttt tgt ctt agc tta ata ggc aaa act cga gaa 3314
Met Val Val Ile Val Phe Cys Leu Ser Leu Ile Gly Lys Thr Arg Glu

1010

1015

1020

gat ctg aac cct ctg aca tca ata aag ttc ctt cga gca cta aga gtt 3362
Asp Leu Asn Pro Leu Thr Ser Ile Lys Phe Leu Arg Ala Leu Arg Val

1025

1030

1035

ctg tcg cag ttt gaa aga atg aag gtg gtc ctg aga gct ttg ata aaa 3410
Leu Ser Gln Phe Glu Arg Met Lys Val Val Leu Arg Ala Leu Ile Lys

1040

1045

1050

aca acc tta ccc act gtg agc gtg ttt cta gtc tgc cta atg atc tgg 3458
 Thr Thr Leu Pro Thr Val Ser Val Phe Leu Val Cys Leu Met Ile Trp
 1055 1060 1065

ctg ctt ttc agt gtt att gga gtg cag tta ttt gct ggc aag ttc tat 3506
 Leu Leu Phe Ser Val Ile Gly Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr
 1070 1075 1080 1085

gaa tgc att gac cca aca aag gga gaa aga ttc cct gta ttt gaa gtt 3554
 Glu Cys Ile Asp Pro Thr Lys Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val
 1090 1095 1100

atg aat aaa agt cag tgt gaa aaa ctg tta ttc aat gaa tca atg ccg 3602
 Met Asn Lys Ser Gln Cys Glu Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro
 1105 1110 1115

tgg gag aat gca aaa ctg aac ttt gat aat gtt gga aat ggt ttt ctt 3650
 Trp Glu Asn Ala Lys Leu Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu
 1120 1125 1130

tct tta ctc caa gtg gca aca ttt aat gga tgg atc agt att atg aat 3698
 Ser Leu Leu Gln Val Ala Thr Phe Asn Gly Trp Ile Ser Ile Met Asn
 1135 1140 1145

tca gca att gat tct gtt ggt gta aac atg cag ccc agc ttt gag tac 3746
 Ser Ala Ile Asp Ser Val Gly Val Asn Met Gln Pro Ser Phe Glu Tyr
 1150 1155 1160 1165

aac ctc tac atg tat agt tac ttt atc atc ttt gtt atc ttt gga tta 3794

Asn Leu Tyr Met Tyr Ser Tyr Phe Ile Ile Phe Val Ile Phe Gly Leu

1170

1175

1180

ttt ctt cct ctc tgt atg ctg att ggt gtt att att cgc aat ttc aac 3842

Phe Leu Pro Leu Cys Met Leu Ile Gly Val Ile Ile Arg Asn Phe Asn

1185

1190

1195

aag cag aaa att aag cag gga gga tca aac atc ttt ata aca gta aaa 3890

Lys Gln Lys Ile Lys Gln Gly Gly Ser Asn Ile Phe Ile Thr Val Lys

1200

1205

1210

cag aaa aaa cag tac cgg gcc ctg aag aag ctc ttg tat gca gac gtc 3938

Gln Lys Lys Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val

1215

1220

1225

cag aaa cca aca ccc cgc ccc aga aac aaa ttc caa ggc ttc ctt ttt 3986

Gln Lys Pro Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe

1230

1235

1240

1245

gac cta gta aca cac cgt gtc ttt aat gtt atc atc ata ctt ctt atc 4034

Asp Leu Val Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile

1250

1255

1260

tgt ttc caa gca aca acc att atg ata caa aag gat gag cag agt cca 4082

Cys Phe Gln Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro

1265

1270

1275

caa atg gaa act gcc atc ttc tgg atg aac tcc att ttt gtc atg ctg 4130

Gln Met Glu Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu

1280

1285

1290

ttc act ctg gaa tgc ata ctg aag ctc act gcc ttc cgt tgc cac tac 4178

Phe Thr Leu Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr

1295

1300

1305

ttc acc agt gca tgg aat gtt cat gac ttt atg gtg gtc att ttc tcc 4226

Phe Thr Ser Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser

1310

1315

1320

1325

att aca ggg ctg ctg cta ccc ttg aca ata gga caa tac ttt gtg cct 4274

Ile Thr Gly Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro

1330

1335

1340

cct tcc ctg gtg cag ctg att ctt ctc tct cga gtc atc cac atc ctg 4322

Pro Ser Leu Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu

1345

1350

1355

cgt cct ggg aaa gga ccg aag gtg ttc cat gac ctg atg ctt ccc ttg 4370

Arg Pro Gly Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu

1360

1365

1370

att ctg gcg ctc cca gca ttg ctg aac att agt ctt ctc atc ttc ctg 4418

Ile Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu

1375

1380

1385

gtc atg ttc atc tac gcc atc ttt gga atg tac aac ttt gcc tat gta 4466

Val Met Phe Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val

1390

1395

1400

1405

aag aaa gaa gcc gga att aat gat gtg tcc aac ttt gag acc ttt gga 4514

Lys Lys Glu Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly

1410

1415

1420

agc agt atg ctc tgt ctc ttc caa gtt aca acg ttt tct ggt tgg gac 4562

Ser Ser Met Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp

1425

1430

1435

ggg atg ctg gat gca att ttc aac agt cag tgg tct gac tgc gat cct 4610

Gly Met Leu Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro

1440

1445

1450

gat aaa att aat cca ggg act cag gtc aag gga gat tgt ggg agc cct 4658

Asp Lys Ile Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro

1455

1460

1465

tct gtt ggg att tct tat ttt gtc agt tac atc ctc ata tca tgg ttg 4706

Ser Val Gly Ile Ser Tyr Phe Val Ser Tyr Ile Leu Ile Ser Trp Leu

1470

1475

1480

1485

atc att gtt aac atg tac att gtg ttg atc atg gag ttc tta agt att 4754

Ile Ile Val Asn Met Tyr Ile Val Leu Ile Met Glu Phe Leu Ser Ile

1490

1495

1500

cct tct cag aaa aaa agc agg acc ttg agt gaa gat gac ttt agg aga 4802

Pro Ser Gln Lys Lys Ser Arg Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Arg Arg

1505

1510

1515

ttc ttc cgg gtg tgg aac agg ttt gac cct gat agg acc cag tac ata 4850
Phe Phe Arg Val Trp Asn Arg Phe Asp Pro Asp Arg Thr Gln Tyr Ile
1520 1525 1530

gac tct agc aag ctt tct gat ttt gca gct gct ctg gat cct cct ctt 4898
Asp Ser Ser Lys Leu Ser Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu
1535 1540 1545

ttc atg gca aaa cca aac aag ggc cag ctt gtg gcc atg gat ctc ccc 4946
Phe Met Ala Lys Pro Asn Lys Gly Gln Leu Val Ala Met Asp Leu Pro
1550 1555 1560 1565

atg gct gcg gga gac aga atc cac tgc ctc gac att tta ctt gcc ttt 4994
Met Ala Ala Gly Asp Arg Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Leu Ala Phe
1570 1575 1580

acg aaa aga gtg atg gga aag gat gag agg gtg gag aaa atc ctt tca 5042
Thr Lys Arg Val Met Gly Lys Asp Glu Arg Val Glu Lys Ile Leu Ser
1585 1590 1595

gag ata gaa tcc ggg ttc atg tta gcg aac cct ttc aaa atc act tat 5090
Glu Ile Glu Ser Gly Phe Met Leu Ala Asn Pro Phe Lys Ile Thr Tyr
1600 1605 1610

gag ccg att aca act act ttg aaa cgc aaa caa gag gca gtt tca gca 5138
Glu Pro Ile Thr Thr Thr Leu Lys Arg Lys Gln Glu Ala Val Ser Ala
1615 1620 1625

acc atc atc cag cgt gca tat aaa agc tac cgc tta agg caa aat gac 5186

Thr Ile Ile Gln Arg Ala Tyr Lys Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Asp
1630 1635 1640 1645

aag aat gta tca gat act cct gct ata gat gac cgc aga gat gat ctt 5234
Lys Asn Val Ser Asp Thr Pro Ala Ile Asp Asp Arg Arg Asp Asp Leu
1650 1655 1660

act tct aaa ggt gct cac tct ggc aaa atc gag gag aag gca tct att 5282
Thr Ser Lys Gly Ala His Ser Gly Lys Ile Glu Glu Lys Ala Ser Ile
1665 1670 1675

cag acc cag att taa tgacacttcc cacttctact ttctttacat atgtccccaa 5337
Gln Thr Gln Ile
1680

gcactaaatg ttaactgatc ttaagctgga gatcagaaac tagagataat gataacatct 5397

gtgtgcccag acatctccat gacaagctca gctttagggt cagtcttctg atgcatcaga 5457

aagacagcag ctcagcgttg ctgcg 5482

<210> 3

<211> 1681

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Leu Thr Ser Pro Glu Pro Lys Gly Leu Val Pro Phe Thr Thr Glu

1	5	10	15
Ser	Leu	Glu	Leu
Ile	Glu	Asn	His
Ile	Ala	Lys	Lys
Cys	Asn	Glu	Asp
20	25	30	
Pro	Glu	Glu	Glu
Gly	Leu	Lys	Pro
Ser	Arg	Asn	Leu
Glu	Ala	Gly	
35	40	45	
Lys	Arg	Leu	Pro
Ile	Pro	Tyr	Gly
Thr	Leu	Pro	Arg
Gly	Thr	Val	Ser
50	55	60	
Glu	Pro	Leu	Glu
Asp	Val	Asp	Pro
Tyr	Tyr	Tyr	Val
Lys	Arg	Asn	Thr
65	70	75	80
Phe	Met	Val	Leu
Asn	Arg	Ser	Arg
Val	Ile	Phe	Arg
Phe	Asn	Ala	Val
85	90	95	
Ser	Ile	Phe	Cys
Thr	Leu	Ser	Pro
Leu	Asn	Ser	Leu
Arg	Arg	Ala	Ala
100	105	110	
Ile	Lys	Ala	Leu
Val	His	Pro	Leu
Phe	Arg	Leu	Leu
Ile	Leu	Ile	Ser
115	120	125	
Val	Leu	Thr	Asp
Ser	Ile	Leu	Met
Cys	Met	Ser	Asn
Leu	Pro	Glu	Trp
130	135	140	
Ile	Leu	Ala	Ile
Glu	Asn	Thr	Leu
Leu	Gly	Ile	Tyr
Ala	Phe	Glu	Ile
145	150	155	160
Leu	Val	Lys	Val
Ile	Ala	Arg	Gly
Ile	Trp	Ala	Gly
Ser	Phe	Ser	Phe
165	170	175	
Leu	Gly	Asp	Leu
Trp	Asn	Trp	Leu
Asp	Phe	Ser	Val
Thr	Leu	Phe	Glu
180	185	190	
Leu	Ile	Thr	Arg
Phe	Ser	Pro	Leu
Ser	Ser	Phe	Leu
Met	Leu	Lys	Thr
195	200	205	
Ile	Arg	Thr	Phe
Arg	Ile	Leu	Lys
Ile	Ile	Pro	Leu
Asn	His	Gly	Leu
210	215	220	
Gln	Ser	Ile	Val
Met	Thr	Leu	Ala
Gln	Cys	Leu	Lys
Lys	Lys	Leu	Phe
Gly			
225	230	235	240

Ala Ile Ala Leu Ala Leu Phe Phe Leu Ala Val Phe Ser Leu Leu Gly			
245	250	255	
Met Gly Leu Phe Met Gly Asn Leu Lys His Lys Cys Leu Arg Trp Pro			
260	265	270	
Glu Glu Asn Glu Asn Glu Thr Leu His Asn Arg Thr Gly Ser Leu Asn			
275	280	285	
Tyr Ser Pro Glu Arg Ile Asn Phe Tyr Tyr Met Glu Gly Ala Lys Tyr			
290	295	300	
Ala Leu Leu Cys Gly Asn Arg Thr Asp Ala Gly Gln Cys Pro Glu Gly			
305	310	315	320
Tyr Val Cys Val Lys Glu Gly Thr Asn Pro Asp Asn Gly Phe Thr Ser			
325	330	335	
Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Leu Leu Ala Met Phe Arg Leu Met Thr			
340	345	350	
Gln Asp Tyr Pro Glu Leu Leu Tyr His Gln Ile Leu Tyr Ala Ser Gly			
355	360	365	
Lys Val Tyr Met Ile Phe Phe Val Met Ile Ser Phe Trp Phe Ala Phe			
370	375	380	
Tyr Leu Thr Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Thr Met Thr Tyr Glu Lys			
385	390	395	400
Glu Lys Gln Arg Ala Cys Glu Glu Ser Gly Gly Leu Asp Pro Lys Cys			
405	410	415	
Gln Gln Thr Val Lys Glu Leu Asp Glu Glu Asn Asp Ala Ala Glu Met			
420	425	430	
Glu Thr Thr Gln Ile Glu Met Lys Lys Arg Ser Pro Thr Ser Ile Asn			
435	440	445	
Thr Thr Leu Asp Ile Leu Glu Asp Thr Thr Leu Gly His Arg Glu Glu			
450	455	460	
Pro Glu Thr Ser Arg Lys Lys Cys Pro Ile Cys Trp His Lys Phe Ile			

465	470	475	480
Lys Thr Cys Phe Ile Trp Lys Cys Ser Pro Cys Trp Val Lys Leu Asn			
	485	490	495
Glu Phe Ala Asp Arg Val Ile Thr His Pro Leu Ala Asp Leu Phe Leu			
	500	505	510
Val Ile Cys Ile Val Leu Asn Ile Cys Phe Leu Ala Leu Glu His Phe			
	515	520	525
Pro Met Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Leu His Val Gly Asn Leu Val			
	530	535	540
Phe Ile Gly Ile Tyr Thr Ile Glu Leu Ile Leu Lys Ile Ile Ala Met			
545	550	555	560
His Pro Tyr Gly Tyr Phe Gln Ile Ser Trp Asn Ile Phe Asp Ser Ile			
	565	570	575
Leu Val Val Leu Glu Leu Thr Glu Ile Leu Leu Ala Asp Val Glu Gly			
	580	585	590
Leu Ala Val Leu Ile Thr Val Pro Leu Ile Phe Ile Lys Leu Gly Lys			
	595	600	605
Tyr Gly Pro Pro Phe Lys Ser Leu Met Arg Ile Leu Gly Ser Ser Leu			
	610	615	620
Met Ala Leu Lys Asp Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Phe Val Tyr Phe			
625	630	635	640
Ser Ala Val Phe Gly Met Lys Leu Phe Gly Arg Ser Tyr Lys Asp Cys			
	645	650	655
Val Cys His Ile Lys Glu Asp Cys Gln Pro Gln Arg Trp His Met Ser			
	660	665	670
Asp Phe Leu His Ala Tyr Met Thr Val Phe Arg Ile Leu Cys Gly Glu			
	675	680	685
Trp Ile Glu Thr Leu Trp Glu Cys Met Glu Val Ala Gly Gln Ala Trp			
	690	695	700

Cys Ile Pro Phe Tyr Met Met Val Ile Leu Ile Gly Asn Leu Leu Ile
 705 710 715 720
 Leu Tyr Leu Phe Val Thr Leu Val Ser Ser Phe Ser Tyr Tyr Asp Ala
 725 730 735
 Thr Ser Glu Val Asn Lys Glu Ala Lys Asn Leu Gln Leu Ala Met Ala
 740 745 750
 Arg Ile Lys Ser Gly Ile Asn Ser Met Leu Leu Lys Leu Met Cys Thr
 755 760 765
 Glu Arg Ser Val Pro Thr Glu Ala Thr Asp Gln Ile Cys Asp Pro Ser
 770 775 780
 Val Lys Glu Asn Ile Ser Gly His Thr Leu Ser Glu Leu Ser Asn Thr
 785 790 795 800
 Gln Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Asp Gln Ser Ser Ser Thr Glu Lys Thr
 805 810 815
 Pro Val Thr Glu Ser Glu Ser Gln Ser Leu Ile Ala Ser Pro Ser Ala
 820 825 830
 Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile Glu Asn Leu
 835 840 845
 Asp Asn Lys Glu Thr Arg Ser Lys Ser Gly Asn Gly Gly Ser Lys Glu
 850 855 860
 Lys Met Lys Gln Ser Ser Ser Ser Glu Cys Ser Thr Val Asp Ile Ala
 865 870 875 880
 Ile Ser Glu Glu Glu Glu Met Val Tyr Glu His Glu Lys Ser Lys Leu
 885 890 895
 His Lys Asn Gly Tyr Glu Arg Lys Ser Ser Thr Gly Gln Ile Ser Arg
 900 905 910
 Glu Ser Arg Asn Gly Lys Ile Trp Lys Asn Ile Arg Lys Thr Cys Cys
 915 920 925
 Lys Ile Val Glu Asn Ser Trp Phe Glu Cys Phe Ile Gly Leu Val Thr

930	935	940	
Leu Leu Cys Thr Gly Thr Leu Ala Leu Glu Asp Ile Tyr Ile Asp Gln			
945	950	955	960
Arg Lys Thr Thr Lys Ile Leu Leu Glu Tyr Ala Asp Met Ile Phe Ala			
	965	970	975
Tyr Ile Phe Ile Leu Glu Met Leu Leu Lys Trp Val Ala Tyr Gly Phe			
	980	985	990
Lys Ala Phe Phe Ser Asn Asn Trp Tyr Lys Leu Asp Phe Met Val Val			
	995	1000	1005
Ile Val Phe Cys Leu Ser Leu Ile Gly Lys Thr Arg Glu Asp Leu Asn			
1010	1015	1020	
Pro Leu Thr Ser Ile Lys Phe Leu Arg Ala Leu Arg Val Leu Ser Gln			
1025	1030	1035	1040
Phe Glu Arg Met Lys Val Val Leu Arg Ala Leu Ile Lys Thr Thr Leu			
	1045	1050	1055
Pro Thr Val Ser Val Phe Leu Val Cys Leu Met Ile Trp Leu Leu Phe			
	1060	1065	1070
Ser Val Ile Gly Val Gln Leu Phe Ala Gly Lys Phe Tyr Glu Cys Ile			
1075	1080	1085	
Asp Pro Thr Lys Gly Glu Arg Phe Pro Val Phe Glu Val Met Asn Lys			
1090	1095	1100	
Ser Gln Cys Glu Lys Leu Leu Phe Asn Glu Ser Met Pro Trp Glu Asn			
1105	1110	1115	1120
Ala Lys Leu Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Gly Phe Leu Ser Leu Leu			
	1125	1130	1135
Gln Val Ala Thr Phe Asn Gly Trp Ile Ser Ile Met Asn Ser Ala Ile			
	1140	1145	1150
Asp Ser Val Gly Val Asn Met Gln Pro Ser Phe Glu Tyr Asn Leu Tyr			
1155	1160	1165	

Met Tyr Ser Tyr Phe Ile Ile Phe Val Ile Phe Gly Leu Phe Leu Pro			
1170	1175	1180	
Leu Cys Met Leu Ile Gly Val Ile Ile Arg Asn Phe Asn Lys Gln Lys			
1185	1190	1195	1200
Ile Lys Gln Gly Gly Ser Asn Ile Phe Ile Thr Val Lys Gln Lys Lys			
1205	1210	1215	
Gln Tyr Arg Ala Leu Lys Lys Leu Leu Tyr Ala Asp Val Gln Lys Pro			
1220	1225	1230	
Thr Pro Arg Pro Arg Asn Lys Phe Gln Gly Phe Leu Phe Asp Leu Val			
1235	1240	1245	
Thr His Arg Val Phe Asn Val Ile Ile Ile Leu Leu Ile Cys Phe Gln			
1250	1255	1260	
Ala Thr Thr Ile Met Ile Gln Lys Asp Glu Gln Ser Pro Gln Met Glu			
1265	1270	1275	1280
Thr Ala Ile Phe Trp Met Asn Ser Ile Phe Val Met Leu Phe Thr Leu			
1285	1290	1295	
Glu Cys Ile Leu Lys Leu Thr Ala Phe Arg Cys His Tyr Phe Thr Ser			
1300	1305	1310	
Ala Trp Asn Val His Asp Phe Met Val Val Ile Phe Ser Ile Thr Gly			
1315	1320	1325	
Leu Leu Leu Pro Leu Thr Ile Gly Gln Tyr Phe Val Pro Pro Ser Leu			
1330	1335	1340	
Val Gln Leu Ile Leu Leu Ser Arg Val Ile His Ile Leu Arg Pro Gly			
1345	1350	1355	1360
Lys Gly Pro Lys Val Phe His Asp Leu Met Leu Pro Leu Ile Leu Ala			
1365	1370	1375	
Leu Pro Ala Leu Leu Asn Ile Ser Leu Leu Ile Phe Leu Val Met Phe			
1380	1385	1390	
Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Tyr Asn Phe Ala Tyr Val Lys Lys Glu			

1395	1400	1405
Ala Gly Ile Asn Asp Val Ser Asn Phe Glu Thr Phe Gly Ser Ser Met		
1410	1415	1420
Leu Cys Leu Phe Gln Val Thr Thr Phe Ser Gly Trp Asp Gly Met Leu		
1425	1430	1435
Asp Ala Ile Phe Asn Ser Gln Trp Ser Asp Cys Asp Pro Asp Lys Ile		1440
1445	1450	1455
Asn Pro Gly Thr Gln Val Lys Gly Asp Cys Gly Ser Pro Ser Val Gly		
1460	1465	1470
Ile Ser Tyr Phe Val Ser Tyr Ile Leu Ile Ser Trp Leu Ile Ile Val		
1475	1480	1485
Asn Met Tyr Ile Val Leu Ile Met Glu Phe Leu Ser Ile Pro Ser Gln		
1490	1495	1500
Lys Lys Ser Arg Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Arg Arg Phe Phe Arg		
1505	1510	1515
Val Trp Asn Arg Phe Asp Pro Asp Arg Thr Gln Tyr Ile Asp Ser Ser		1520
1525	1530	1535
Lys Leu Ser Asp Phe Ala Ala Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Met Ala		
1540	1545	1550
Lys Pro Asn Lys Gly Gln Leu Val Ala Met Asp Leu Pro Met Ala Ala		
1555	1560	1565
Gly Asp Arg Ile His Cys Leu Asp Ile Leu Leu Ala Phe Thr Lys Arg		
1570	1575	1580
Val Met Gly Lys Asp Glu Arg Val Glu Lys Ile Leu Ser Glu Ile Glu		
1585	1590	1595
Ser Gly Phe Met Leu Ala Asn Pro Phe Lys Ile Thr Tyr Glu Pro Ile		1600
1605	1610	1615
Thr Thr Thr Leu Lys Arg Lys Gln Glu Ala Val Ser Ala Thr Ile Ile		
1620	1625	1630

Gln Arg Ala Tyr Lys Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Asn Asp Lys Asn Val

1635

1640

1645

Ser Asp Thr Pro Ala Ile Asp Asp Arg Arg Asp Asp Leu Thr Ser Lys

1650

1655

1660

Gly Ala His Ser Gly Lys Ile Glu Glu Lys Ala Ser Ile Gln Thr Gln

1665

1670

1675

1680

Ile

<210> 4

<211> 6927

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

aagctttact ctcacagaga aaagtcttct gagtgatcaa ttgccaacga tacaacctca 60
 ccttagttta ccctgacctg tgaaagatgg ccttcaacag tggagaataa ggagttctag 120
 ctgagatggt tcattaagcg acatattcat ggatcagctt ttgatggcag attttcaggc 180
 tccttttctc cactgccaat aattttacaa aacacaattt taaaattgta gtctttatgg 240
 gaaacaattc atcctataga tgttgtcaag gacaaaacat tttcactcct gggcagtttt 300
 gttgttccct tccctcactg tcatggcgct aaagcggtag ctcaccccca gattaggggc 360
 ccaggtgtaa ttgttcttaa gtctgaaatt gtaggggaga gttctttgaa ctcactcttt 420
 catgagttca aagaacatat gacaacttat tgatagaatg actttacaca tggccatatt 480
 ttacacattt actattttac aggtataaaa ccgaaaatgt tgacttcccc agagccgaag 540
 ggccttgtcc catttacaac agagtcactt gaacttatag aaaatcacat tgctaaaaaa 600
 tgcaatgaag accccgaaga agaagaaggt ttaaaaccaa gtcgtaatct agaagctggc 660
 aaaagacttc caattcccta tggaaccctc cctcgaggaa ccgtgtcaga gcccttggaa 720
 gatgtggatc catactacta tgtaagaga aatgtaagta ttaactgtta tcattgaagc 780

tatattttac ttcgcttata ttcagccact tgaaatgtaa ttgagataag acttaaagaa 840
 aattaataga gaaggcattc tttcataatc tattctttgt gggggtcaac atgctcaaga 900
 tagttaaacc tgataaaata tctgagtaat atattatggt taatgaccgt agtatatata 960
 ctgctattcc ttaatataag tggctattgt gaaaatatgc taattacat tttctgatta 1020
 gcaattttta aacaatcatg aaatatattag aatatggaca gaaatttcaa ataccttgat 1080
 aacttactag tcaaaacagt acattttatt ttaatcatat ataaatccac aaattcaaac 1140
 ctccctcatt tccaggaaga ctttagagac ctagaaatta tgtatacaca aacacacaca 1200
 cacacataca cacacacaca cgcacacgca aatgcacacc ctaccatcac aaacacaaaa 1260
 taagtacaag aatgatttct gttagaaaat tcagacatgt ggattgatga agatagatga 1320
 gtcttgtttc aaaagcatgg tttgggggct ggagaaatgt ctcagtttct aatagcactg 1380
 gctgtttctc tggacgtcat aagattgatt gcagtccctg tacagtaggt cacagccttt 1440
 tgtaactcta gttccagaag atttgacctt cttttggcca ctatgggcac tgggaatgca 1500
 aataattcat atatgcacac agtgaagaca tctatatact tgaaatgaga taaaatttta 1560
 ggtacagctt gcagaatact tggaatttta ataaagccaa ggtagaacag ttttaaggaca 1620
 aatggaatgg caacagccaa gattgattct acaagagggc atagaaaggg ctgtgctatt 1680
 actggaaaat cagttatgtt gttgactgtg gcaaactga gagagtggag gtgtcatcat 1740
 ggaattactg tagtggacaa ggtcatttgg ggtgaatgtg gcagatgaat aaaaccaagc 1800
 taataccttt cttaattaaa agaaaagtga tcaatacaga aaataaaata gaacataaaa 1860
 gacagggaga aatataaggt agagaagagg aggagagaaa gagatgaggg agaagagaag 1920
 gggtgagaat gggaagagga agagaagaga gataggtaga aatgaagaga ggggaggaag 1980
 ggacttgat attacagtta atttacctag tgtacaaact gatagttctt agtataaatg 2040
 gcttttatgt aaatatgatg attactgtct tctaattatc tattttttaa taatcataaa 2100
 atattttacac tataaaagaa aaagagagaa ggaggagaga aagaacaaga aggaaatagg 2160
 gtagagggaa ccctgagatt cagtgtctat gtcaggaaaa gaaacagtaa aatatgactg 2220
 atgaaaaatg ccaatgtctg tagcttgaaa gagtgaagtt acattgacag aaagtgaat 2280
 aaagtttatt tactagcatc ttgatattca tgtatcatat tcaatgatgt tataatctaat 2340
 gaggagatga gactgaacga aaatatctgc agaaaaatac attcattgca taactgttcc 2400
 tataataatg tcatggtgtc atttgaaata ttttaaggac attttagtta aaatgcaagt 2460
 tcagtcctca tttgtattgt tctggcactc actttgtggt gtgcttgagt tgataatggc 2520

cagtaacctt aggattgcct gtcaatattg cagccatctt aatactgagt aaggtatgca 2580
 ggcatgctag acatgggaat actgccattg aagataaaat caaagctctt aagaaacaaa 2640
 acaaatactt tatgacaggc cccatgtcca gcagtagttg gccaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700
 ttgtgatttt gattcttttg tcagggtggc atgtttggag acagggattc cctgagtagc 2760
 cctggctgtc ctggaactca ctctgcagtc caggctggcc tcgaactcag agatctgctt 2820
 gcttctgtct tctgagttct aggattacgg gtataagttt ttattaaaag tataaggctt 2880
 tgctttttgt tgttgttttt ttttgtttgt ttgtttgttt tgttttttgg ttggttgttt 2940
 ttgtttgtgt tgggtgggtgt ggtggtagtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3000
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtggaggg agagagagag tgtgctgttt ctgttggaat 3060
 tttttgtcat tttcttttaa cttgttatgt ttggtttctt ttgagaaaga atgaaggaaac 3120
 ctgaagttgg ttggatacgg gtgtggggag gatcttggaat tgagttgaga aaggacaaag 3180
 aatataatca aagcttacta tatgaaaaat taaataaaat gtgaaataac tacaaaaatc 3240
 tcaaaacaac attttgagtgt atttaggata ctagcagcta tgaggcccat gggttgaaat 3300
 ttgccagtga cttcatgcac tctaaagcct gcaaagtgtga cttcatgaac tctgaagcct 3360
 gccagggtga cctcatgctc tttgaagcct gactgggtga ctttatgcac tcagtgtgtc 3420
 tctcagtaac atcacactgt tcaagtatct gggttgtatt tggcttactc tcttacacat 3480
 agcacagaga caaataatca taaaattaag actatgtatg aaatcaggag aaaacctgaa 3540
 agtacgcata ccttcacaat gacacacaca tatattgaac tccacatgga gtctgcaatt 3600
 gttttggaag ctactatgga aagtagaatt tacacaacca ggtatattat ttgtttctac 3660
 ctgtttttatt taagtggaga tgggagaata ggtacaatag ttaaacaag cctcatagca 3720
 gttatatatt gaactacact tatctgagaa ttgagacca gagtagattc cagttagagc 3780
 agacatgcat ggagaagtgt tggcagttgt atattcttat aatttctttt tcatatgcgt 3840
 ctgtcaacat aggaagcaat aagtcatacc tcctatatca ttatcagaat atatggtaga 3900
 ctgtatagtc tattctattg catataagat taatttttaa gccaggcctt ctggcagggc 3960
 tataattctc aaacaacaaa gtattgcaga ttcaagtcct ctgtgggtcta aactgtgagt 4020
 tcaaggtcag ccttaacaat ttaatgaaat ctattttcaa gagaaaaaga atataaagat 4080
 cctcaggaga aataatggaa gagagtttgc ccagcacaca tgaggccctt gtcacagagg 4140
 aagaaaatat tacatatatt ttatttataa aaatatagtt atcttattat ataacatgct 4200
 atgttatgtt atgttttatg ttataacaca tgacatttaa tctcatagtt ttcagaatta 4260

actggatttt cagtgttagc tggatcaaac tcagggcctg ctgaagggtg aacaaacact 4320
 gttcttcaag ttacattacc agacagtaca tgттаатgca cccctacatt aatactttct 4380
 ctgaagggtg acatatacgt aacacacaca cacacacaca cacacatata tatatatata 4440
 catatacaca cacacatata tatatacact ttcaattacc atatataata tataccatat 4500
 acattatagt aatgttcatt tatatgaaca aatgtaaaaa tgagcacaca tatgtatgaa 4560
 tgtacataag cccacatgta catatgtata aataagccca tccacctacc tatatatgga 4620
 acaatgtctg ttttagaata tttatgtttc ttactatatt tattaagact tagtacttta 4680
 gtatccacaa tccttgtgtt tatattacat aaattactat ttttagatag gttcatatca 4740
 ataataattaa ataagttagg ttttgtaaaa acattaattt ttaggattta ccttgtaatt 4800
 gttttatttt tttattcgat attttcttta ttacatttc aaatgctttc ccgaaagtcc 4860
 cctataacct cccacctccc tgctccccta ctacccact cccatttctt ggccctggtg 4920
 ttcccctgta ttggggcata taaagtttgc aagaccaagg ggtctctatt cccaatgatg 4980
 gccgactagg ccattctctg ctacatattc agctagagac acgagctctg gggatactgg 5040
 ttaataattg ttttattttt aatataattt atttaaaata gaattacata aattatcctc 5100
 ttattttctc cccctacagtg tctccctcat aaataatata aacaattgat gtgagatttg 5160
 accattgctt ttataacact tcattgactt tttttctgat ataaaattaa aatttttaca 5220
 ttcatthaagt tatgagataa aggccctctg atgctttgaa tgcaaateca cacaccatct 5280
 gaagagtttc tttttcatta gttcaagggtg tgattgcacc ataatgactt tcttaagtac 5340
 aaaccagcaa aaaataaata aattaattaa ttattaaaat aaaataagtg gtgagctatc 5400
 aggcaagtcc aatatatagt gaaaactact ccccttgctt taaaaacaaa tgtcaaagcc 5460
 aatgaaaata tgaaataatt tcaaactggt gagcattggt aatatgttgc ttcagttctc 5520
 cattctgttt gttaatgtct ttcctgtggt tccttacaga ctttcatggt cttaaacaga 5580
 agcagagtca tcttcagggt caatgcgggt tccatcttct gcacattgtc tcctctaaac 5640
 tccttcagaa gagcagctat caaggctttg gtgcatccat atcctttcaa agtgtgatgg 5700
 gttgtgtcat cggcatacta aaaataagtc ctgatgttct gtcattcaac ccctgttgta 5760
 gtaatattta acaaatatca attcttattc ttcaaataga atgacatgta ttttcaatat 5820
 ttacaaaaga atctcgcccc ttatatctac agatgcaatt tactgggtctt ttgtaatgtg 5880
 atttcttctc cattattcct tgaccctggc ttaccctttt tcgctgtctg attttaatca 5940
 gcgttctcac tgacagcata cttatgtgca tgagtaatct accagaatgg atattggcaa 6000

tagagtaagt tacttagttt tgctatatat aataaagtct gtaattatat tttggtttta 6060
 acattttaat atttattgta ttccattaaa ttacaaaaac atgttatgaa atgaaacatg 6120
 atactattta aatttttaaa tgtttaaaaa agttataaag acaagagggtt tgtttcactc 6180
 acagctttga aggttcaaga gcacctatgc tggtcagctt cagggacaat taggtcctct 6240
 cacctaatta acctgtggcc tgtggaaaca ggagaagctc tttcagaagc agccattcat 6300
 gtcttgatgc tgtaagccca tgactggtat gaagcctgcc acaacttttc tcttactctt 6360
 cttgtgggtc ttgtgcaaac aagcaggcat gcgctccagt gccacaagga cttcaagtg 6420
 caccacagct ctagtgctcc gtaaactctt gcctcaccat gatcgggatc aagttctaaa 6480
 tatgtagaat attgtagaca tctgaaaaca aacctcatct tcatatttct tttctgtata 6540
 tactcgtatg tttgtggggc atagcaatat gaacaccatg actaaatttt ctaaataaaa 6600
 caaacatgta tatgcacata cacatatata tagatgtata ttcatcaatt tggggtttta 6660
 ttttgccctt tcattcttct tacttaattc ctgttggtgt tattttattt gattcatgtt 6720
 ctttatacca cttgcctttg actcctgttc cagactcttg aatcctggaa ttacatcttc 6780
 ttatcacgac ttacatata tacagttcta tatagactga aggtttaatt atattaatta 6840
 attatgttca ttggaatatt taggtccttt gctaaatgta tataccatgt ttcacctcat 6900
 gcttgttttc ttccttattt aaagctt 6927

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer1

<400> 5

atgttgactt cccagagcc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer2

<400> 6

aaccaggcaa agcgccattc

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer3

<400> 7

catcttccaa gggctctgac a

21

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Ser Val Ser Glu Thr Val Pro Ile Ala Ser Gly Glu Ser Asp Ile Lys

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスの遺伝子地図(a)、ゲノムDNAのサザンブロットの結果(b)、ゲノムPCRの結果(c)及びウエスタンブロットの結果(d)を示す図である。

【図 2】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスの胚、脊髄神経節及び胸部における lacZ 発現部位を示す図である。

【図 3】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスの脳における lacZ 発現部位を示す図である。

【図 4】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスにおける Fos 核タンパクの発現に対する水分飢餓の及ぼす影響に関する結果を示す図である。

【図 5】

本発明におけるマウス Na_v2 チャネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響に関する結果を示す図である。

【図 6】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスにおける各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の結果を示す図である。

【図 7】

本発明の Na_v2 ノックアウトマウスにおける 24 時間水分飢餓の前後において 0.3M の NaCl に対する嗜好率と総摂取量の測定結果を示す図である。

【図 8】

本発明の $\text{Na}_v 2$ ノックアウトマウスにおけるナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験の結果を示す図である。

【図 9】

野性型マウス及び $\text{Na}_v 2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した脊髄後根神経節の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比 ($\text{F}340/\text{F}380$) の蛍光イメージング結果を示す図である。

【図 10】

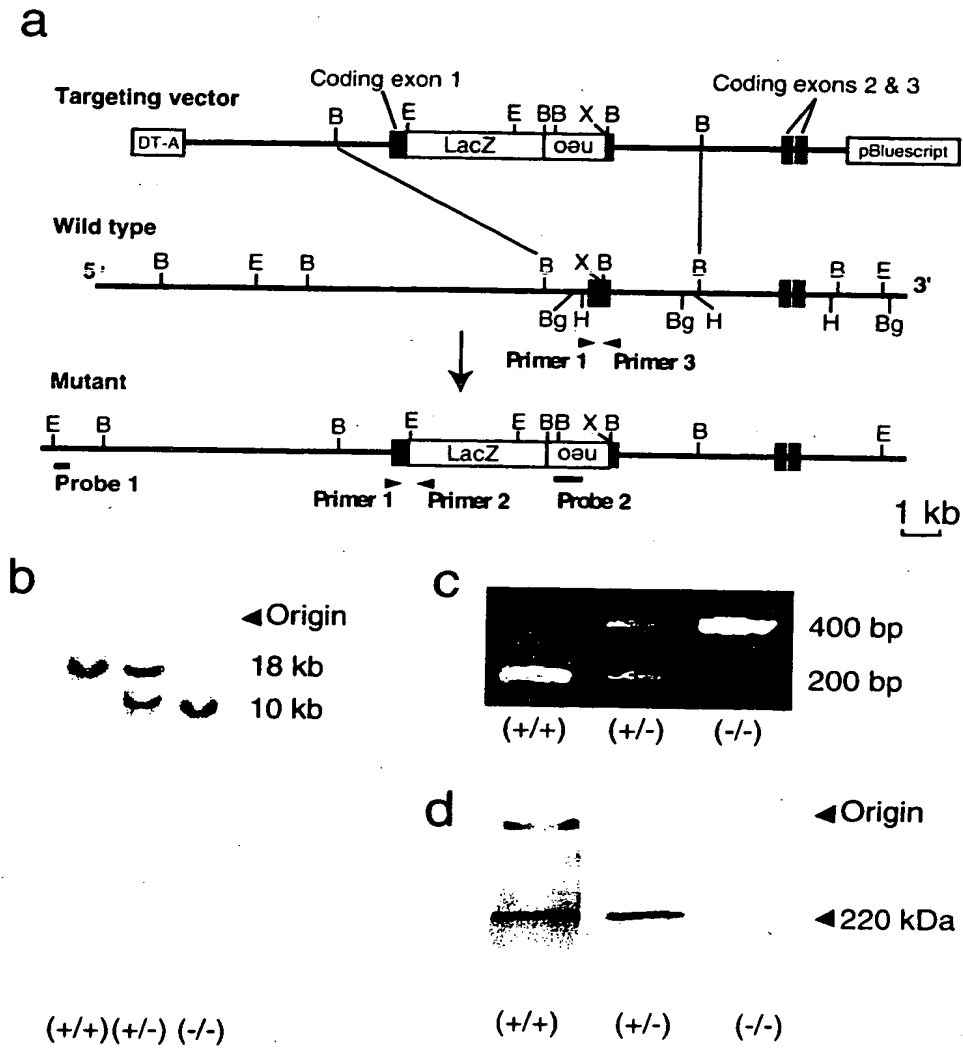
野性型マウス及び $\text{Na}_v 2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した脊髄後根神経節の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比 ($\text{F}340/\text{F}380$) の蛍光イメージング結果を示す図である。

【図 11】

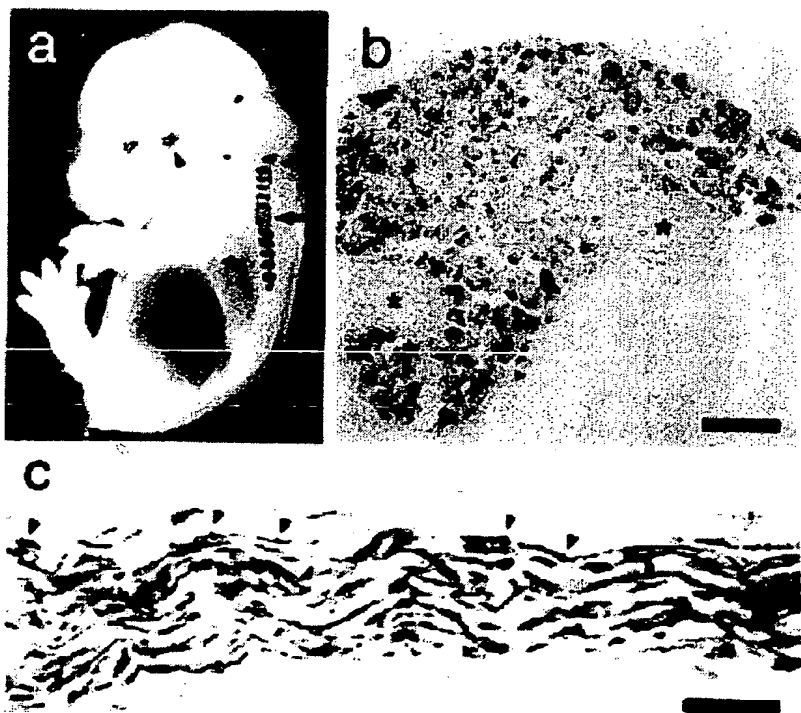
野性型マウス及び $\text{Na}_v 2$ 遺伝子欠損型マウスから調製した脳弓下器官の神経細胞について、細胞内ナトリウムイオン及び細胞内カルシウムイオンの蛍光比 ($\text{F}340/\text{F}380$) の蛍光イメージング結果を示す図である。

【書類名】 図面

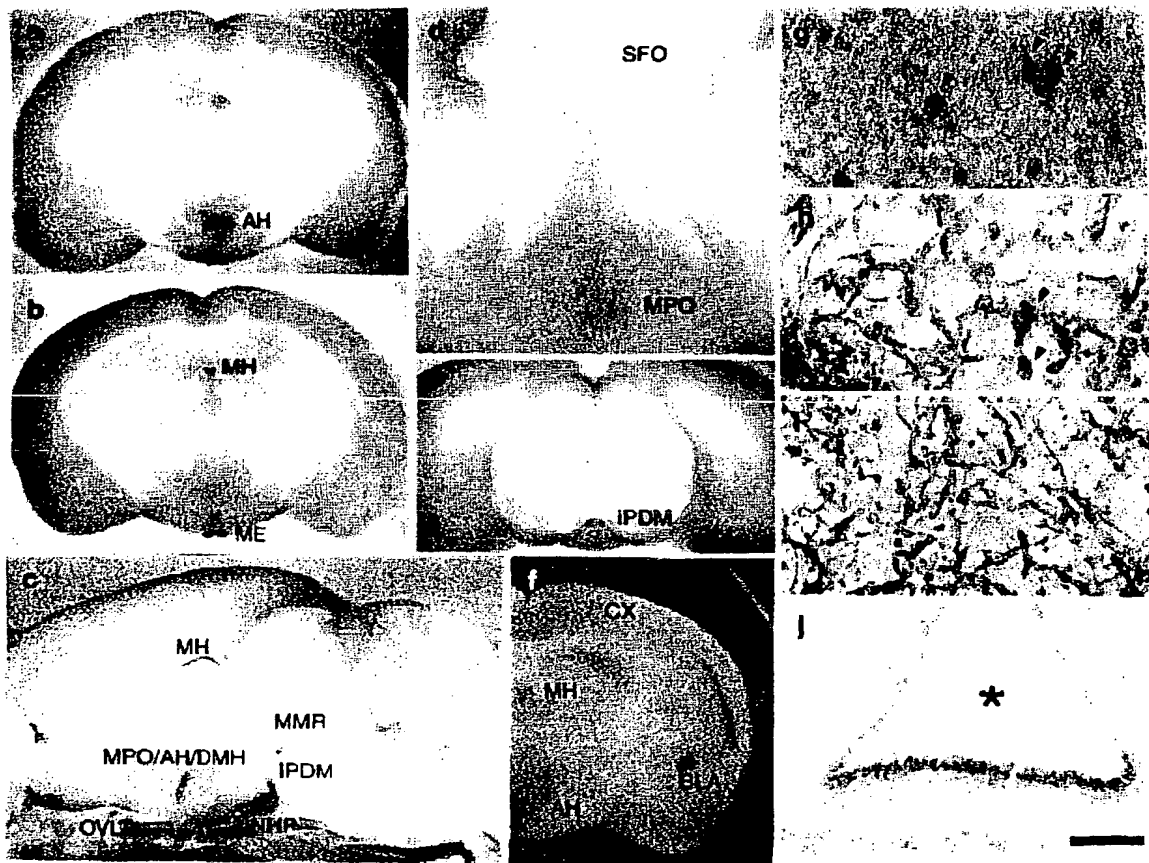
【図 1】



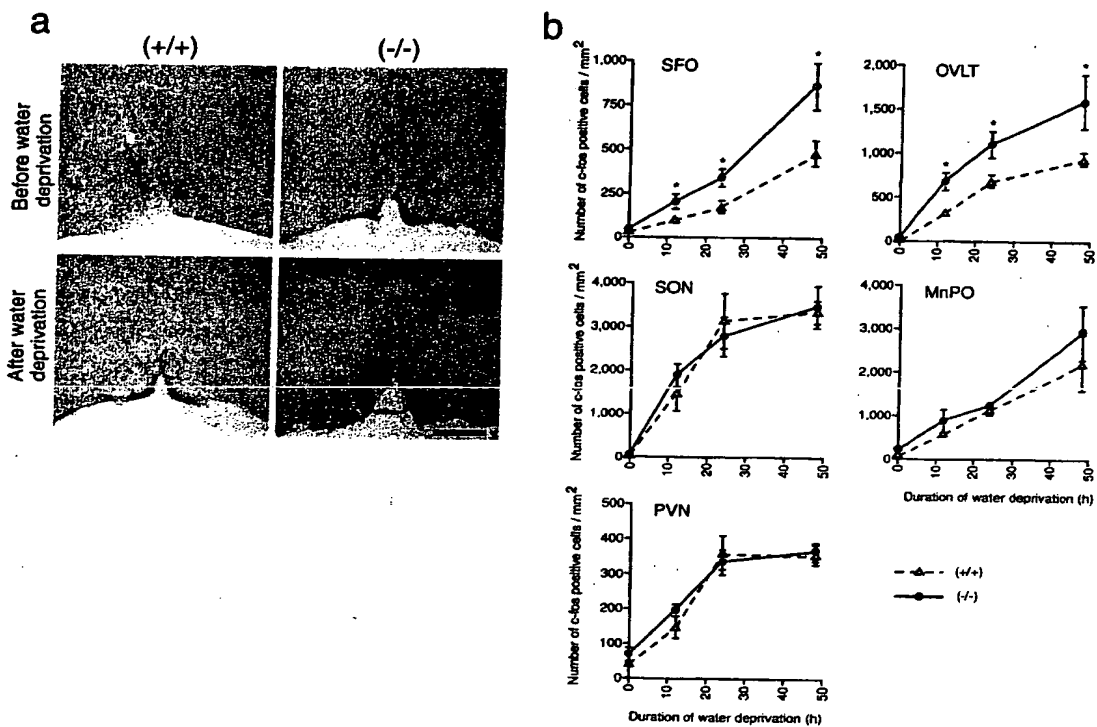
【図2】



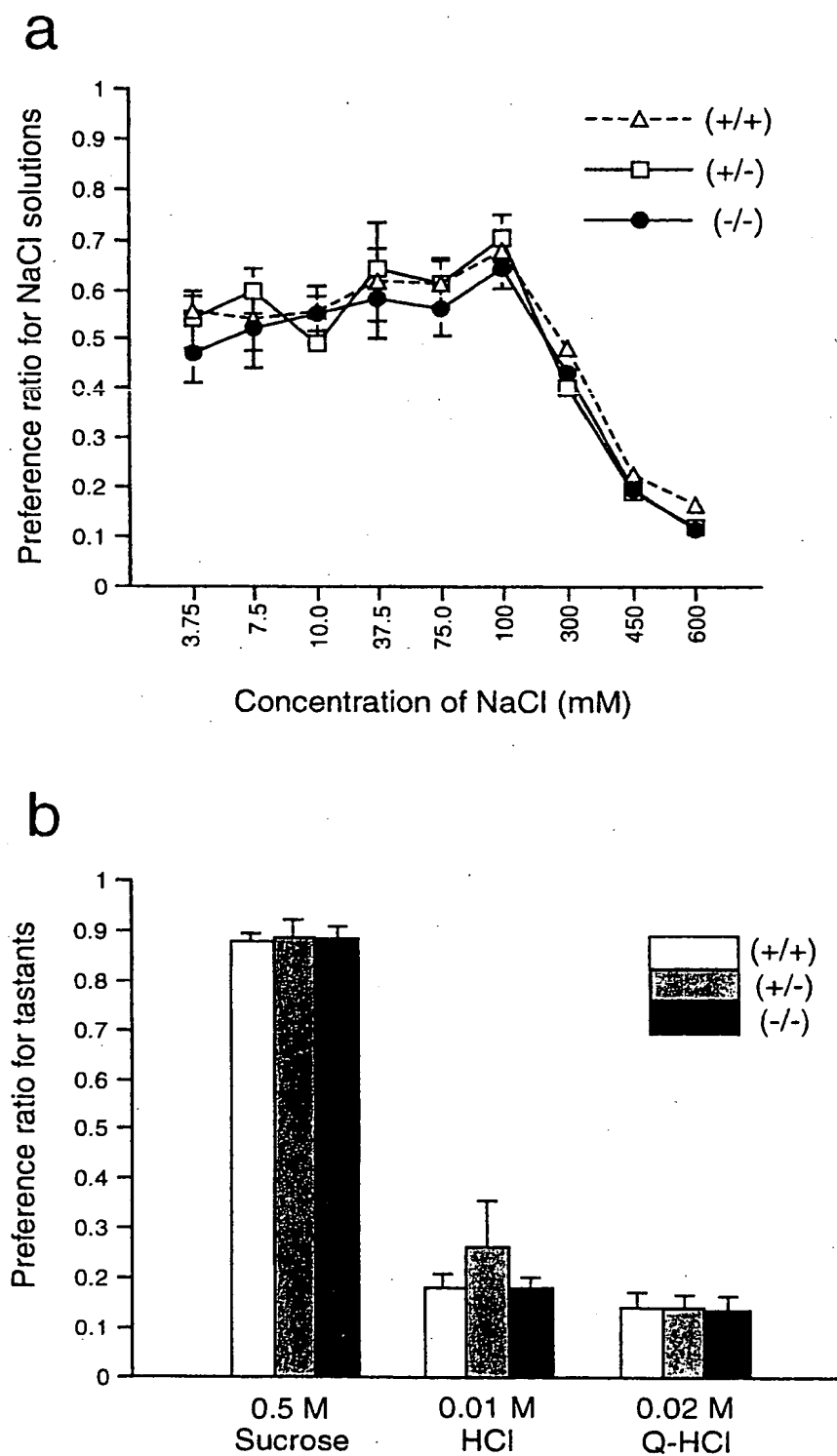
【図3】



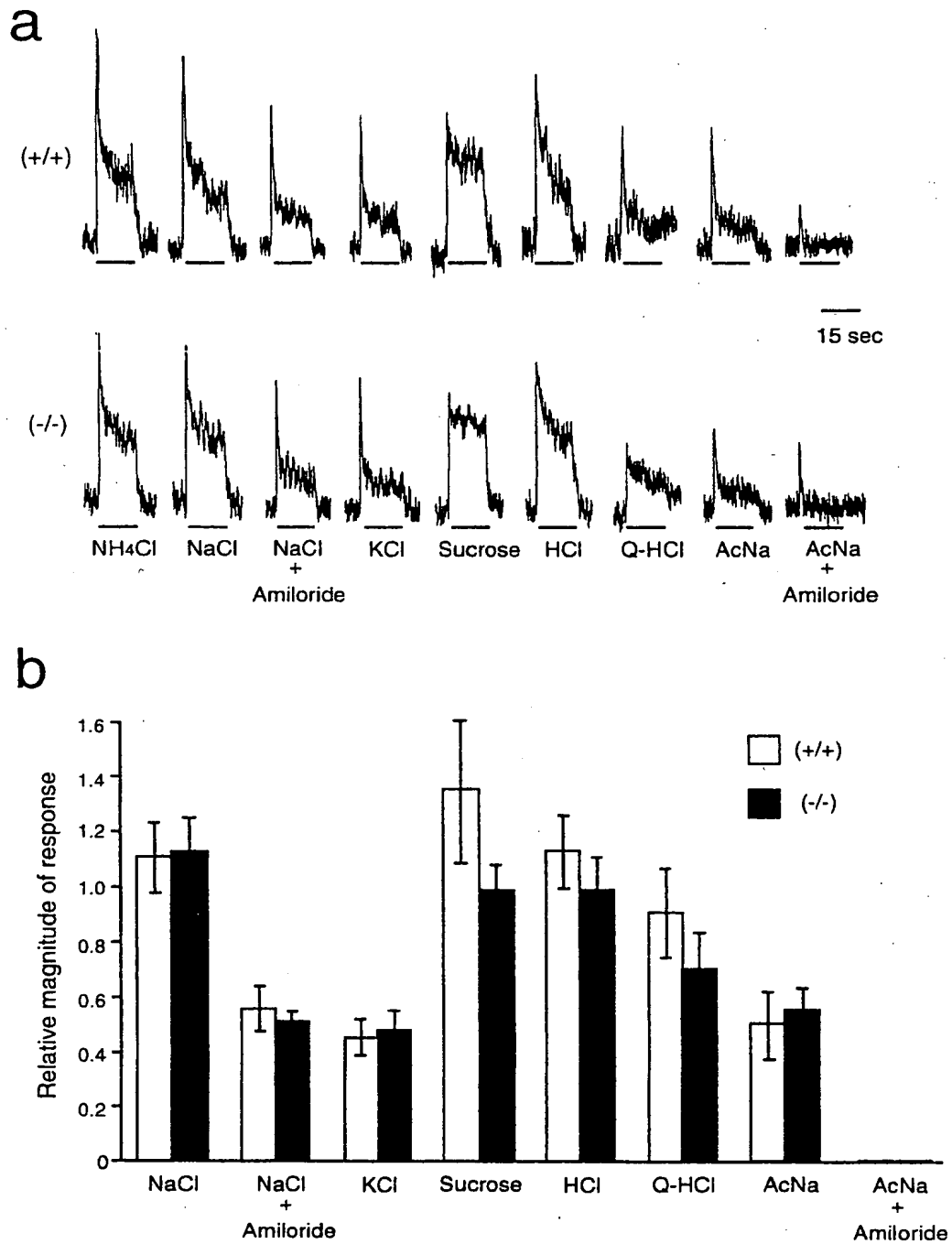
【図4】



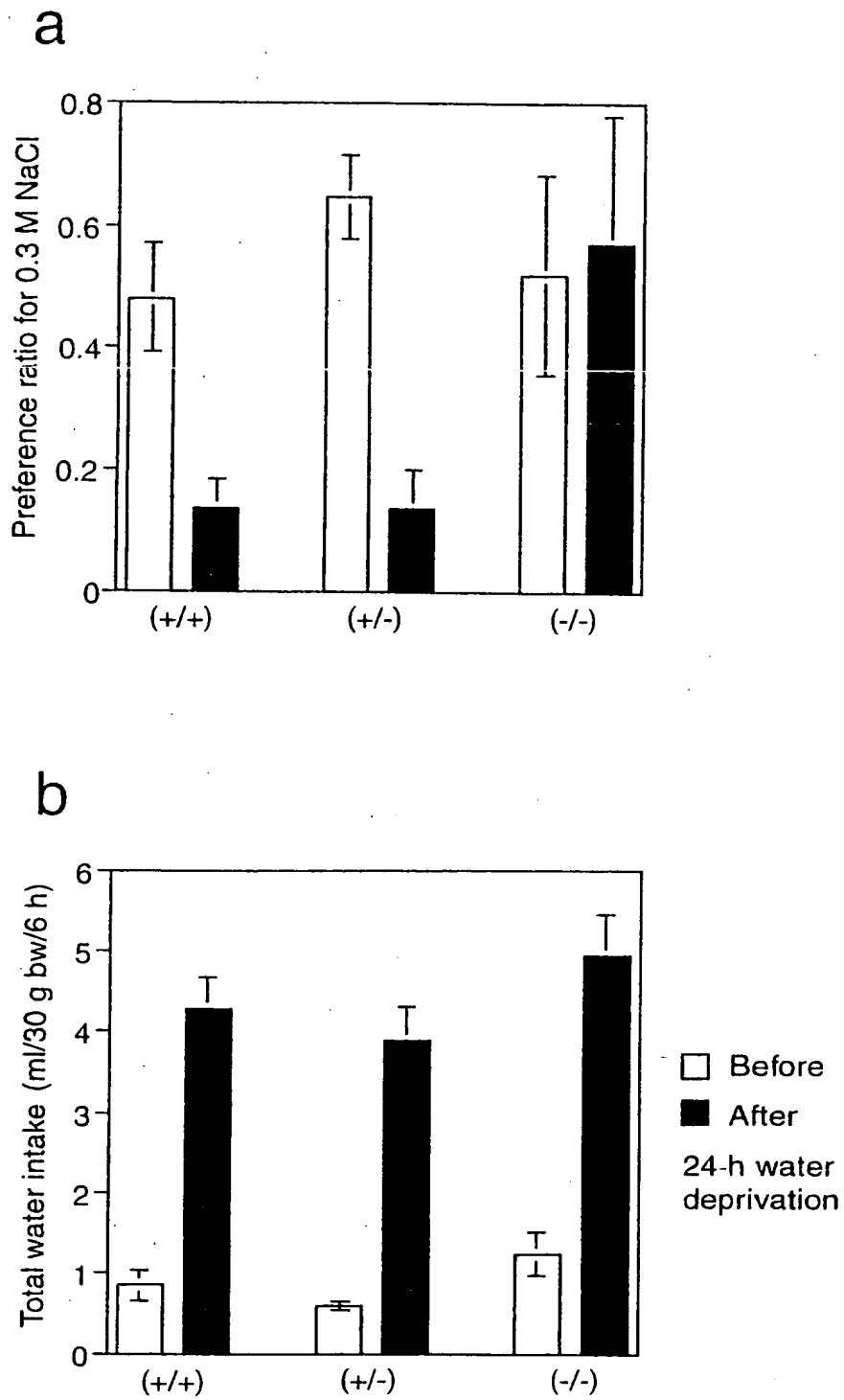
【図 5】



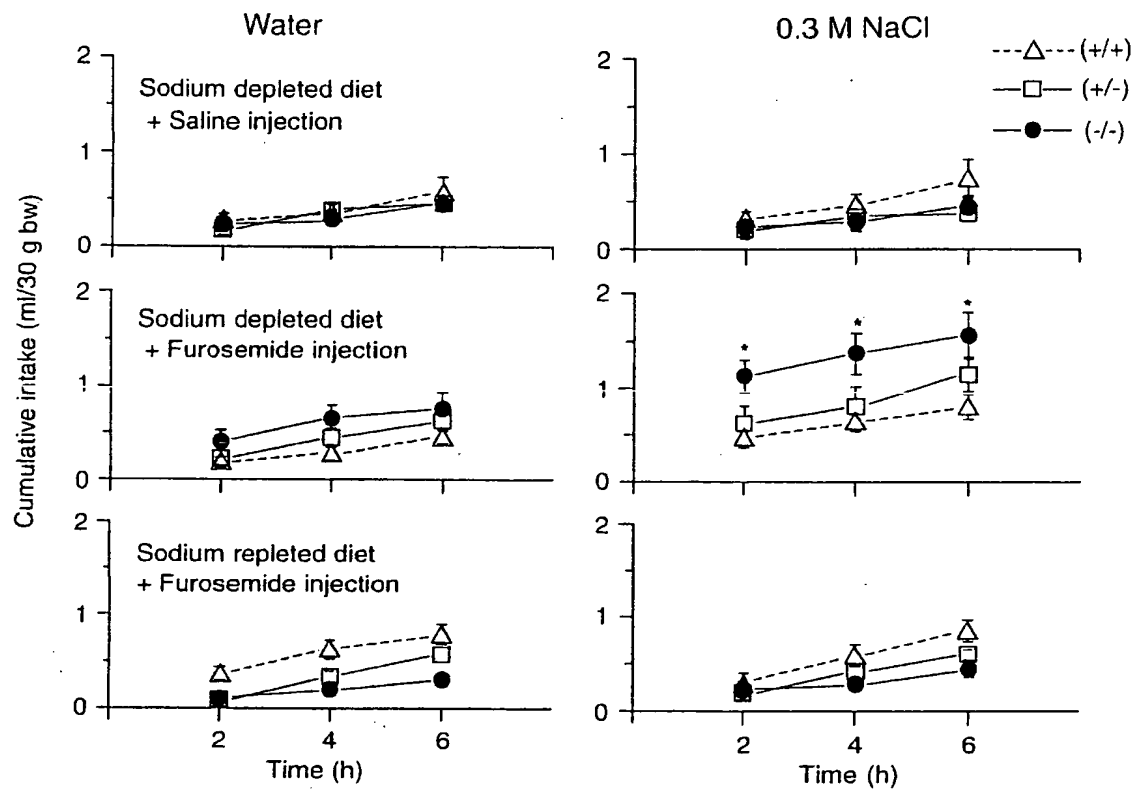
【図 6】



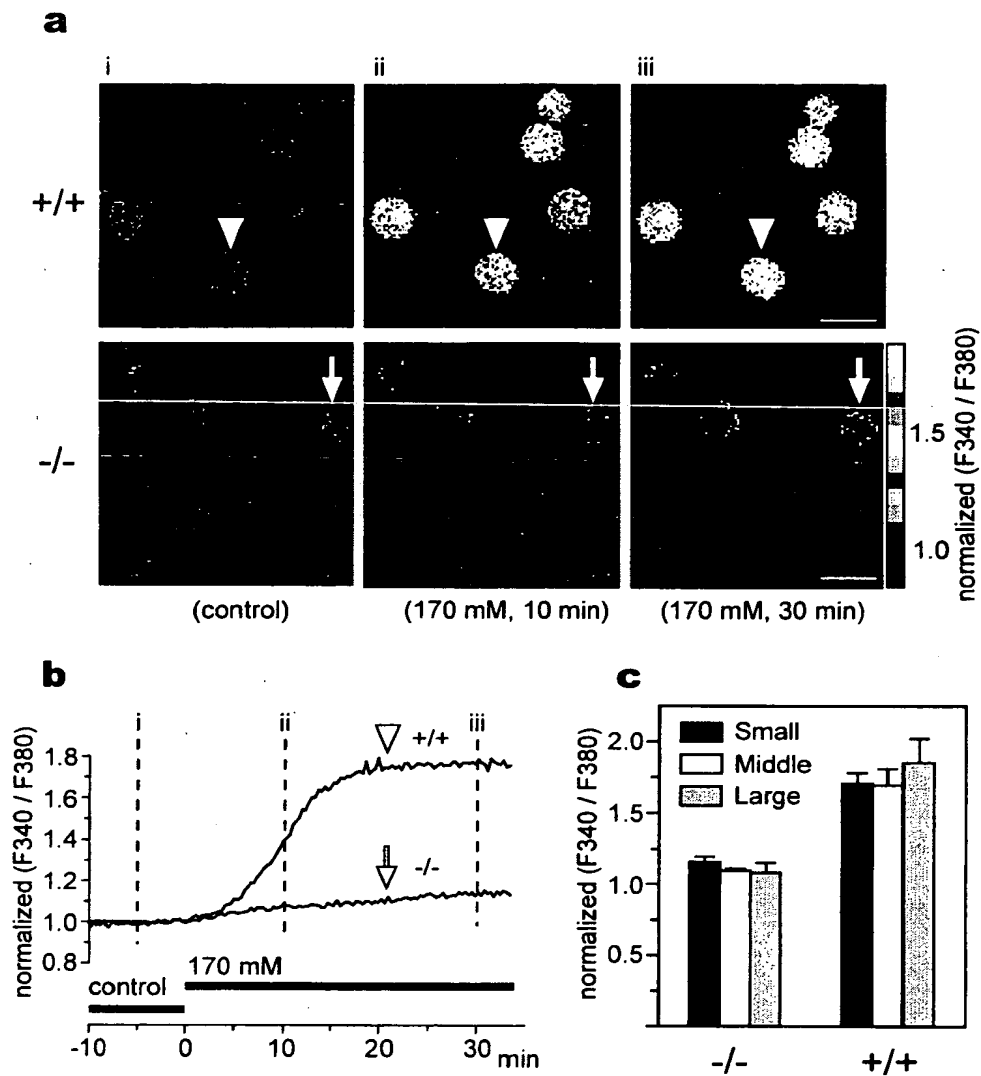
【図 7】



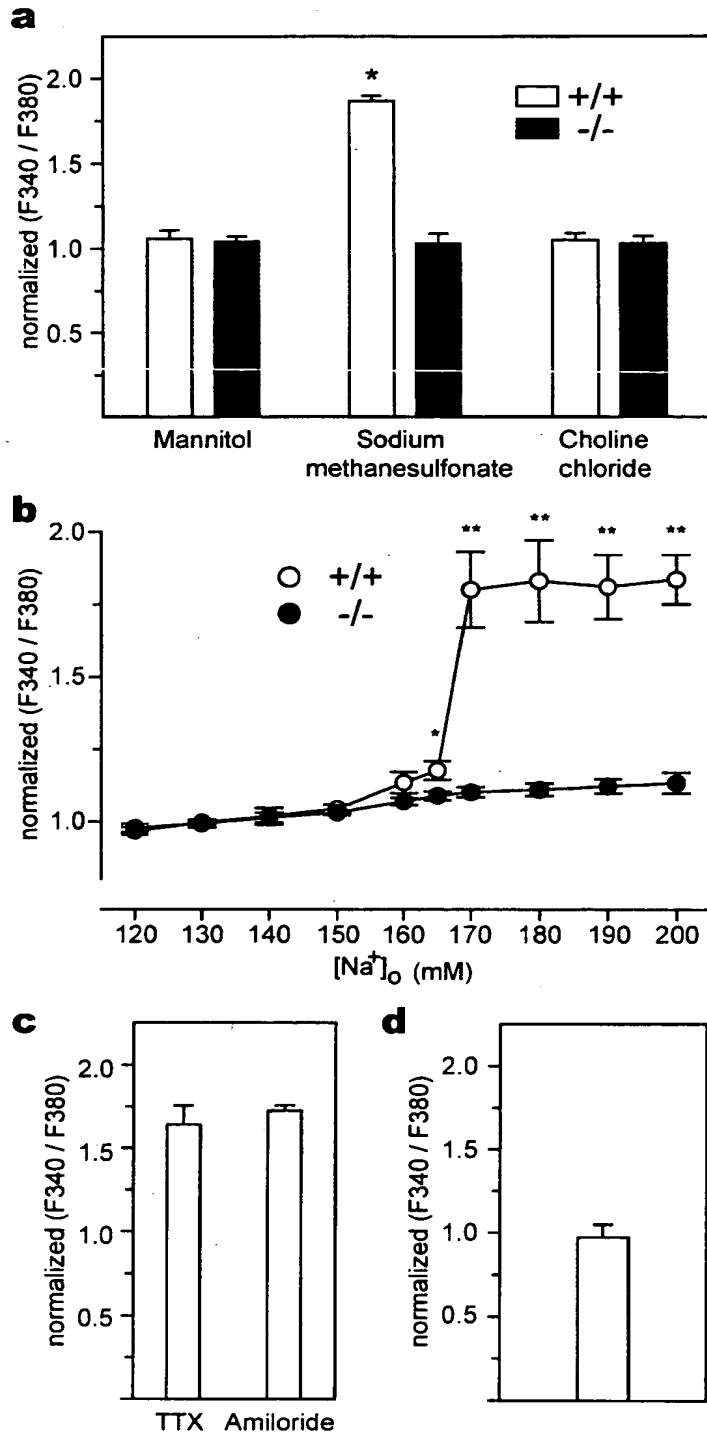
【図 8】



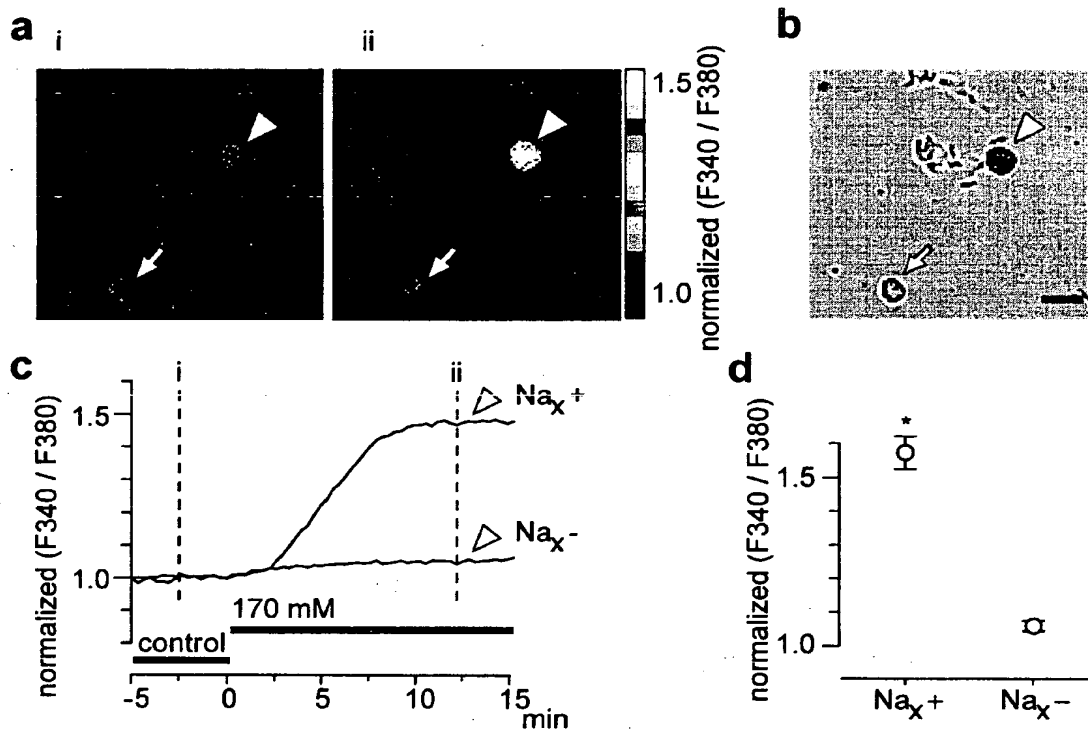
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 塩分過剰摂取実験モデル動物として有用な、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば Na_v2 チャネル遺伝子欠損非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 ラット NaGcDNA をプローブとして、マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ゲノムDNAの Na_v2 遺伝子を単離し、 Na_v2 のエキソン部分に、ネオ遺伝子等マーカー遺伝子を挿入してターゲットベクターを作製し、作製されたターゲットベクターをES細胞に導入し、相同的組換えを起こしたES細胞を選択し、このES細胞系を用いて生殖系列のキメラマウスを作製し、野生型マウスと交配させることによって得られるヘテロ接合体マウス同士を交配させることによって Na_v2 ノックアウトマウスを作製する。

特2001-222263

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [391012718]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地

氏 名 岡崎国立共同研究機構長